



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Tiago Casella

Caracterização molecular de genes de resistência a
cefalosporinas de espectro estendido em *Escherichia coli*
isoladas de frango e carnes de frango

São José do Rio Preto
2016

Tiago Casella

Caracterização molecular de genes de resistência a
cefalosporinas de espectro estendido em *Escherichia coli*
isoladas de frango e carnes de frango

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Mara Corrêa Lelles Nogueira

Co-orientador: Prof. Dr. Gabriel Osvaldo Gutkind

Co-orientador: Prof. Dr. Jean-Yves Madec

São José do Rio Preto
2016

Casella, Tiago.

Caracterização molecular de genes de resistência a cefalosporinas de espectro estendido em *Escherichia coli* isoladas de frango e carnes de frango / Tiago Casella. -- São José do Rio Preto, 2016
152 f. : il., tab.

Orientador: Mara Corrêa Lelles Nogueira

Coorientador: Gabriel Osvaldo Gutkind

Coorientador: Jean-Yves Madec

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia veterinária. 2. Frango de corte. 3. *Escherichia coli*.
4. Resistência microbiana a medicamentos. 5. Cefalosporinas.
I. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 579.62

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Tiago Casella

Caracterização molecular de genes de resistência a
cefalosporinas de espectro estendido em *Escherichia coli*
isoladas de frango e carnes de frango

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Mara Corrêa Lelles Nogueira
FAMERP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior
UNESP – Jaboticabal

Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama Kobayashi
UEL – Londrina

Prof. Dr. Leonardo Neves de Andrade
USP – Ribeirão Preto

Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman
USP – São Paulo

São José do Rio Preto
03 de novembro de 2016

*Dedico este trabalho aos milhões de pessoas
que morrem devido a infecções por bactérias
resistentes a antimicrobianos não tratadas
devidamente.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e a meus Santos, por guiarem, constantemente, meus pensamentos e ideias por caminhos prósperos e de luz. Obrigado por fornecer e manter minha doce vida!

À minha família, que sempre esteve presente nos diversos momentos da minha vida, apoiando de todas as formas a minha carreira.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Mara Corrêa Lelles Nogueira, pela oportunidade, paciência, incentivo, ensinamentos e por ter acreditado na minha capacidade. Muito obrigado por me ensinar que sempre há uma resposta esperando para ser encontrada! A você meus eternos respeito e admiração!

Agradezco a mi jefe de Argentina, Prof. Dr. Gabriel Osvaldo Gutkind, la primera oportunidad de conocer nuevos horizontes en la investigación científica fuera de mi cotidiano en Brasil.

Je vous remerci, Prof. Dr. Jean-Yves MADEC, mon maître de stage en France, de m'avoir dans votre laboratoire et me guider pendant toute l'année en ANSES !

À Carolina de Souza Stuchi, pelo seu amor, carinho, apoio e compreensão nos meus necessários momentos de ausência. Você escreveu letras fortemente impressas no meu Livro da Vida.

Ao Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, pela indispensável colaboração e por ceder o Laboratório de Pesquisa em Virologia para a realização de grande parte deste trabalho.

Je remercie, aussi, à Dr. Marisa HAENNI, les précieux conseils et les mots sages à des moments qui étaient nécessaires ! Vous étai comme une mère d'accueil temporaire.

Aos membros da banca examinadora deste trabalho de Doutorado, que, tão gentilmente, aceitaram dispensar seu tempo na correção deste trabalho, adicionando experiência e conhecimento no mesmo.

Às colaboradoras Luceli Ferreira de Souza, Luciana Moran Conceição e Valéria Daltibari Fraga, que, com placidez e generosidade, auxiliaram em diversas etapas deste trabalho.

Às minhas eternas “Chefinhas”, Milena Polotto e Fernanda Tolentino, por seus tão valiosos ensinamentos e sinceridade, agradeço por grande parte do que hoje sei!

Aos professores da Pós-Graduação, por contribuírem nobremente para o meu enriquecimento intelectual acadêmico, também como pela amizade ao longo dos anos, que ajudaram a formar meu caráter profissional.

Aos amigos-irmãos do coração, João (ahora, Juan), Nana e Tiaguinho – e, antes tarde do que nunca, Bruno e Marcus – pela fiel e sincera amizade. Minha eterna entrega a vocês!

A todos os colegas da FAMERP, da UBA e da ANSES, agradeço pela agradável companhia e presença nos momentos divertidos durante qualquer etapa da execução deste trabalho. Não ousou citar nomes, por medo de, injustamente, me esquecer de alguém. Obrigado por me aguentarem!

(A mis colegas desde la FAMERP, la UBA y la ANSES, gracias por la compañía agradable y presencia en los momentos de diversión durante cualquier etapa de la implementación de este trabajo. No me atrevo a dar nombres, por temor a olvidar injustamente a alguien. ¡Gracias por tolerarme!)

(Aux collègues des laboratoires de la FAMERP, de l'UBA et de l'ANSES, je vous remercie l'agréable compagnie et sa présence dans les moments d'amusement à tout stade de la mise en œuvre de ce travail. Je n'ose vous nommer, de peur d'oublier injustement quelqu'un. Je vous remercie de me tolérer!)

Aos demais amigos de fora da vida acadêmica, pelas incontáveis e impagáveis situações de companheirismo, emoções e risos. Vocês também foram essenciais. Muito obrigado!

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação do IBILCE/UNESP, pela grande contribuição no desenvolvimento e realização de toda minha Pós-Graduação, sempre orientando, com paciência, os passos a serem tomados.

Ao IBILCE/UNESP, pela formação que trago desde a Graduação.

À FAMERP, à UBA e à ANSES, pelo espaço amplamente utilizado durante o desenvolvimento deste Doutorado.

(Agradezco a la FAMERP, la UBA y la ANSES, el espacio utilizado durante el desarrollo de esta tesis doctoral.)

(Je remercie la FAMERP, l'UBA et l'ANSES, l'espace largement utilisé au cours du développement de cette thèse.)

Agradeço, também, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo imprescindível apoio financeiro, durante o Doutorado no Brasil e no estágio de Doutorado Sanduíche no Exterior!

Agradeço, por fim, às pessoas que, por descuido da minha memória, deixei de citar aqui, mas que, com certeza, auxiliaram de alguma forma para que eu completasse mais essa etapa da minha vida, não somente profissional, mas também pessoal!

RESUMO

A resistência a cefalosporinas de espectro estendido (ESC) mediada pela produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) por Enterobacteriaceae é um problema de saúde pública global. Neste contexto, o aumento da resistência a ESC entre *Escherichia coli* isoladas de animais de produção é uma questão importante, uma vez que bactérias comensais de animais de produção podem contaminar os produtos alimentícios e chegar ao intestino humano via cadeia alimentar. O Brasil é um importante produtor e o maior exportador de carne de frango no mundo. Assim, é de extrema importância monitorar a presença dessas bactérias neste setor alimentar. No presente estudo, foi realizada uma comparação do genótipo de resistência a ESC em *E. coli* isoladas a partir de carnes de frango no Brasil e na França, considerando que não há relação comercial de carne de frango entre esses dois países. Esta abordagem pode ser útil para compreender as dinâmicas dos fatores de resistência na cadeia de produção de frangos. Além disso, linhagens isoladas do trato gastrointestinal de frangos no Brasil foram também estudadas. Para isso, amostras de carnes de frango de diferentes pontos do varejo e *swabs* de cloaca de frangos de três diferentes fazendas foram coletadas no Estado de São Paulo, Brasil. Também, amostras de carnes de frango de diferentes pontos do varejo de Lyon, França, foram amostradas. As amostras de carne e os *swabs* de cloaca de frangos foram inoculados em ágar MacConkey acrescido com ESC. As colônias foram identificadas por sistema automatizado, e a suscetibilidade aos antimicrobianos foi testada por disco-difusão. PCR para detecção de genes *bla*_{ESBL} e *bla*_{pAmpC} e para a determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli* foram realizadas. Os genes *bla* foram sequenciados e os plasmídeos foram caracterizados pelo esquema PBRT e por *southern blot*/hibridação de géis de PFGE-S1. Quase todas as carnes de frango apresentaram, ao menos, uma linhagem de *E. coli* resistente a ESC, e 53,8% dos frangos analisados também estavam colonizados por *E. coli* resistente a ESC. Resistência a aminoglicosídeos, fenicóis, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclina e trimetoprim também foi detectada. Um total de 60 linhagens isoladas de amostras do Brasil foram estudadas, e o gene *bla*_{CTX-M-2} foi o principal responsável pela resistência a ESC, mas *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-8} também foram detectados. De 77 linhagens isoladas de amostras de carne de frango da França, o gene *bla*_{CTX-M-1} foi o principal responsável pela resistência a ESC, mas *bla*_{TEM-52}, *bla*_{CMY-2} e *bla*_{SHV-12} também foram detectados. A maioria dos *bla*_{CTX-M-2} estão associados à *ISCR1* e a integrons complexos de classe 1, e *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-55}, e os oito *bla*_{CMY-2} do Brasil estão precedidos pela *ISEcp1*. O gene *bla*_{CTX-M-8} está associado à *IS10*. Nas amostras do Brasil, um gene *bla*_{CTX-M-2} é carregado por um plasmídeo IncHI2/P,

*bla*_{CTX-M-8} por um plasmídeo IncI1, um gene *bla*_{CTX-M-15} por um plasmídeo IncX1, e os genes *bla*_{CTX-M-55} por plasmídeos IncFII ou IncN/FII. Nas amostras de carnes de frango da França, os genes *bla*_{CTX-M-1} são carregados por plasmídeos IncI1 ou IncFII, *bla*_{TEM-52} por plasmídeos IncI1 ou IncX1, *bla*_{CMY-2} por plasmídeos IncA/C ou IncK, e o gene *bla*_{SHV-12} por um plasmídeo IncI1. Todos os quatro principais grupos filogenéticos de *E. coli* (A, B1, B2, D) foram detectados, porém o filogrupo D foi predominante entre as linhagens do Brasil, e os filogrupos D, A e B1 foram igualmente distribuídos nas linhagens recuperadas na França. Em resumo, *E. coli* presentes na cadeia de produção de frangos carregam genes de ESBL e de AmpC plasmideal, e genes, plasmídeos e linhagens resistentes a antimicrobianos parecem ser específicos em cada região geográfica.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. ESBL. pAmpC. frango.

ABSTRACT

Resistance to extended spectrum cephalosporins (ESC) mediated by the production of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) by Enterobacteriaceae is a global public health concern. In this context, the raise in ESC-resistance among *Escherichia coli* isolated from food-producing animals is an important issue, since commensal bacteria from producing animals may contaminate food products and reach the human gut through the food chain. Brazil is an important producer and the greatest exporter of chicken meat in the world, so, it is of utmost importance to monitor the presence of these bacteria in this food sector. In this study, a comparison of the resistance genotype to ESC in *E. coli* isolated from chicken meat produced in Brazil and France was performed, considering that there is no commercial relationship of chicken meats between these countries. This approach may be useful to understand the dynamics of the resistance factors in chicken production chain. Also, isolates from cloacal swabs collected in Brazil were studied. For this, samples of chicken meat from different markets and chicken cloacal swabs from three separate farms were sampled in the State of São Paulo, Brazil. In addition, chicken meat samples were acquired from markets in Lyon, France. Meat samples and cloacal swabs were inoculated on MacConkey agar supplemented with ESC. Colonies were identified by an automated system, and antimicrobial susceptibility was tested by disc diffusion. PCRs for detection of *bla*_{ESBL} and *bla*_{pAmpC} genes were performed and phylogenetic groups were determined. The *bla* genes were sequenced, and plasmids were characterized by rep-typing and southern blot/hybridization on S1-PFGE gels. Almost all pieces of chicken meat presented at least one ESC-resistant *E. coli*, and 53.8% of chickens were also colonized by ESC-resistant *E. coli*. Resistance to phenicols, quinolones, aminoglycoside and sulphonamides was also detected. A total of 60 strains isolated from Brazilian samples was studied and the *bla*_{CTX-M-2} gene was the main responsible for the ESC-resistance, but *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{CTX-M-8} were also detected. From 77 strains isolated from chicken meat samples from France, the *bla*_{CTX-M-1} gene was the main responsible for ESC-resistance, but *bla*_{TEM-52}, *bla*_{CMY-2} and *bla*_{SHV-12} were also detected. Most of *bla*_{CTX-M-2} were associated to *ISCR1* and complex class 1 integrons, and *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-55}, and the eight *bla*_{CMY-2} from Brazil were preceded by *ISEcp1*. The *bla*_{CTX-M-8} gene was associated to *IS10*. In samples from Brazil, one *bla*_{CTX-M-2} gene was harbored by an IncHI2/P plasmid, *bla*_{CTX-M-8} was carried by an IncI1 plasmid, one *bla*_{CTX-M-15} was carried by an IncX1 plasmid, and the *bla*_{CTX-M-55} genes were harbored by IncFII or IncN/FII plasmids. In chicken meats from France, the *bla*_{CTX-M-1} genes were harbored by IncI1 or IncFII plasmids, *bla*_{TEM-52} were carried by IncI1 or

IncX1 plasmids, *bla*_{CMY-2} were carried by IncA/C or IncK plasmids, and the *bla*_{SHV-12} gene was harbored by an IncII plasmid. All four major phylogenetic groups (A, B1, B2, D) were present, but phylogroup D was predominant among strains from Brazil, and phylogroups D, A and B1 were equally distributed in strains recovered in France. In summary, *E. coli* in the chicken production chain carry genes for ESBL and plasmidic AmpC, and genes, plasmids and antimicrobial resistant strains seem to be specific for each geographic region.

Key words: *Escherichia coli*. ESBL. pAmpC. chicken.

Lista de Ilustrações

- Figura 1 – Representação esquemática da estrutura química de antimicrobianos β -lactâmicos. A cadeia lateral (R) é variável entre os diferentes β -lactâmicos, bem como o anel de tiazolidina, que também apresenta variações entre as classes desse antimicrobiano, sendo, inclusive, inexistente nos monobactâmicos. O anel β -lactâmico está representado em vermelho. (Imagem do autor)..... 25
- Figura 2 – Esquema simplificado da ação inibitória irreversível de enzimas β -lactamases (β L) sobre um antimicrobiano β -lactâmico. (Imagem do autor) 28
- Figura 3 – Árvores filogenéticas da família CTX-M criadas a partir de duas classificações distintas. a) A classificação de D’Andrea e colaboradores distribue as CTX-M em seis grupos, nomeados de acordo com a “enzima tipo” de cada um; o tamanho dos triângulos no final de cada braço da árvore reflete o número de variantes alélicas dentro de cada grupo (D’Andrea *et al.*, 2013). b) A classificação de Zhao e Hu distribue as CTX-M em sete grupos, nomeados de acordo com a enzima que aparece na posição central de cada grupo na árvore filogenética; os tamanhos dos braços da árvore foram desenhados em escala e são proporcionais à quantidade de diferenças entre os resíduos de aminoácidos. As barras de escala de 0,05 e 0,005 representam 5% e 0,5% na diferença de resíduos, respectivamente (Zhao e Hu, 2013). 30
- Figura 4 – Exemplo de resultado do teste fenotípico de produção de ESBL. As setas vermelhas apontam as “zonas fantasmas”, onde houve inibição da β -lactamase da bactéria testada pelos inibidores de β -lactamase, impedindo o crescimento bacteriano. 1: cefquinoma (β -lactâmico); 2: cefepima (β -lactâmico); 3: amoxicilina/ácido clavulânico (β -lactâmico/inibidor de β -lactamase). 50
- Figura 5 – Dendrograma gerado pelo *software* BioNumerics 6.6 para comparação dos perfis eletroforéticos de REP-PCR das linhagens isoladas de carnes e do TGI de frangos do Brasil. A linha vermelha indica similaridade mínima de 90% entre os perfis. (O dendrograma aparece em duas partes separadas por razões de espaço na página deste trabalho.) 62
- Figura 6 – Dendrograma das linhagens de carnes de frango e de coelho da França gerado a partir dos perfis de restrição genômica por *Xba*I seguida de PFGE. A primeira coluna compõe os nomes das linhagens; a segunda coluna (“Pr”), a identificação dos produtores das amostras de carnes; e a terceira coluna, a data de processamento, no AVB-ANSES, das amostras de carne. A linha vermelha indica uma similaridade de 90% entre os perfis. Os retângulos azuis nos nomes das linhagens indicam as consideradas “clonais” provenientes da mesma amostra de carne. O retângulo vermelho indica um *cluster* formado por linhagens provenientes de amostras de carnes diferentes. 63

Figura 7 – *Cluster* das linhagens de carnes de frango da França identificado na Figura 6 pelo retângulo vermelho. Apesar de a linhagem P34B1 apresentar similaridade menor que 90% com as linhagens do *cluster* (89,4%), é possível observar que ela apresenta, claramente, 1 banda de diferença das demais (seta vermelha)..... 65

Figura 8 – Exemplo de resultado de TSA e Teste fenotípico de ESBL. As setas vermelhas apontam as “zonas fantasmas” ou o alargamento do halo de inibição do antimicrobiano, onde houve inibição da β -lactamase da bactéria testada pelos inibidores de β -lactamases, impedindo o crescimento bacteriano. AMX: amoxicilina; CEQ: cefquinoma; PIP: piperacilina; FEP: cefepima; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; CAZ: ceftazidima; TPZ: piperacilina/tazobactam; CF: cefalotina; XNL: ceftiofur; TCC: ticarcilina/ácido clavulânico; ATM: aztreonam; CXM: cefuroxima; FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxima; ETP: ertapenem. 66

Figura 9 – Exemplo de eletroforese, utilizando o aparelho QIAxcel, da multiplex-PCR para detecção de *bla*_{CTX-M}-grupo 1, -grupo 2 e -grupo 9. Branco: tubo sem a adição de qualquer DNA; M: marcador de peso molecular padrão..... 70

Figura 10 – Exemplo de resultado de TSA em uma cepa *E. coli* K12 J53 transconjugante com linhagem carreadora de *bla*_{CTX-M-2}. Como os discos com antimicrobianos estão sempre nas mesmas posições nos TSA realizados no AVB-ANSES, este formato de crescimento bacteriano é típico de cepas transconjugantes com genes *bla*_{CTX-M}. 75

Figura 11 – Exemplo de eletroforese, utilizando o aparelho QIAxcel, da tipagem de plasmídeos pelo esquema PBRT nas cepas transconjugantes do gene *bla*_{CTX-M-55}. Branco: tubo sem a adição de DNA; M: marcador de peso molecular padrão. 76

Figura 12 – Exemplo de *Southern blot* de cepas transconjugantes. a) sonda para detecção de IncFII; b) sonda para detecção de IncN. M: posição do marcador de peso molecular padrão no gel de PFGE; C+ IncF: linhagem do banco de cepas do AVB-ANSES, Lyon previamente caracterizada como positiva para IncFII..... 77

Figura 13 – Técnicas de PGFE-I-*CeuI* e *Southern blot*/Hibridação com sondas para *bla*_{CTX-M} e *rrn* (16S rRNA) em linhagens selvagens que não conjugaram. O resultado da Hibridação com a sonda para *bla*_{CTX-M} não é satisfatório, com marcações de bandas muito fracas..... 78

Lista de Quadros

- Quadro 1 – Filogrupo de *E. coli*, genes *bla* e contexto genético nas 60 linhagens do Brasil...71
- Quadro 2 – Grupo filogenético, gene *bla*, tamanho e grupo de incompatibilidade dos plasmídeos das 77 linhagens de carnes de frango da França.....73

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Frequência (%) de linhagens de <i>E. coli</i> que apresentaram resistência às diferentes classes de antimicrobianos em cada tipo de amostra (carnes e TGI de frangos do Brasil e carnes de frango da França).	68
--	----

Lista de Siglas e Abreviaturas

AMC – amoxicilina/ácido clavulânico

AMX – amoxicilina

AN – amicacina

ANSES – *Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail*

APEC – *Avian Pathogenic Escherichia coli*

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATM – aztreonam

AVB – *Unité d'Antibiorésistance et Virulence Bacteriennes*

BHI – *Brain Heart Infusion*

bla – gene codificador de enzima β -lactamase

C – cloranfenicol

CAZ – ceftazidima

CEQ – cefquinoma

CF – cefalotina

CIM – Centro de Investigaç o de Microrganismos

CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*

CS – colistina

CRF – carne resfriada de frango

CTX – cefotaxima

CXM – cefuroxima

DNA –  cido desoxirribonucleico

DTU – *Danmarks Tekniske Universitet*

ENR – enrofloxacina

ESBL – *Extended-Spectrum β -Lactamase(s)*

ETD – ertapenem

ESC – cefalosporinas(s) de espectro estendido

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

ExPEC – *Extraintestinal pathogenic Escherichia coli*

FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

FEP – cefepima

FFC – florfenicol
FOX – cefoxitina
GM – gentamicina
Inc – grupo de incompatibilidade de plasmídeo
IS – *insertion sequence*
K – canamicina
MLST – *Multilocus Sequence Typing*
NA – ácido nalidíxico
NET – netilmicina
OFX – ofloxacina
pAmpC – *plasmidic AmpC*
PBP – *Penicillin Binding Protein*
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis*
pH – potencial de hidrogênio
PIP – piperacilina
rRNA – ácido ribonucleico ribossômico
S – estreptomicina
SSS – sulfonamidas
ST – *Sequence Type*
TCC – ticarcilina/ácido clavulânico
TE – tetraciclina
TGI – trato gastrointestinal
TIC – ticarcilina
TM – tobramicina
TMP – trimetoprim
TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
TZP – piperacilina/tazobactam
UPEC – *Uropathogenic Escherichia coli*
XNL – ceftiofur

Lista de Símbolos

% – por cento

® – marca registrada

°C – graus centígrados

µg – microgramas

µL – microlitros

µm – micrômetros

µM – micromolar

g – força gravitacional

kb – kilobases

mg – miligramas

mL – mililitros

mm – milímetro

mM – milimolar

pb – pares de base

U – unidade enzimática (corresponde à quantidade de enzima que catalisa uma reação com velocidade de formação de 1 µmol de produto por minuto)

V/cm – voltagem total dividida pela distância, em centímetros, entre os eletrodos

X – quantidade de vezes que uma solução está concentrada em relação à concentração final desejada

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 <i>Escherichia coli</i> : importância da resistência aos antimicrobianos em saúde pública e na cadeia produtora de alimentos	22
1.2 A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos	24
1.2.1 As β -lactamases do tipo AmpC.....	26
1.2.2 As β -lactamases de espectro estendido	27
1.2.3 As enzimas CTX-M	29
1.3 Ambiente genético de <i>bla</i> _{CTX-M} e sua mobilização	32
1.3.1 Plasmídeos: características e associação com <i>bla</i> _{CTX-M}	34
1.3.2 Tamanho molecular dos plasmídeos de resistência.....	35
1.3.3 Genes de localização cromossômica	36
1.4 Classificação de <i>E. coli</i> em grupos filogenéticos	36
1.5 Tipagem molecular de <i>Escherichia coli</i>	37
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 Isolamento, identificação e manutenção de <i>Escherichia coli</i> a partir de carnes de frango do Brasil.....	44
4.2 Isolamento, identificação e manutenção de <i>E. coli</i> a partir de carnes de frango da França.....	45
4.3 <i>E. coli</i> a partir de carnes de coelho da França	46
4.4 Isolamento, identificação e manutenção de <i>E. coli</i> a partir do TGI de frangos no Brasil.....	46
4.5 Tipagem molecular das linhagens do Brasil	47
4.6 Tipagem molecular das linhagens da França.....	48
4.6.1 Tipagem por <i>Multi-Locus Sequence Typing</i>	49
4.7 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e teste fenotípico de β -lactamases	49
4.8 Extração de DNA genômico	51
4.9 Detecção e identificação dos genes de resistência às ESC	51

4.9.1	Identificação e contexto genético dos genes <i>bla</i> _{CTX-M} -grupo 1	52
4.9.2	Identificação de genes <i>bla</i> _{CTX-M} -grupo 8 ou -grupo 25	53
4.9.3	Identificação dos demais genes de resistência detectados	53
4.9.4	Ambiente genético de genes <i>bla</i> _{CTX-M} e <i>bla</i> _{CMY-2}	53
4.10	Ensaio de conjugação bacteriana em meio líquido	55
4.11	Plasmídeos carreadores de genes <i>bla</i>	56
4.11.1	Caracterização dos plasmídeos quanto ao grupo de incompatibilidade	56
4.11.2	Caracterização dos plasmídeos quanto ao tamanho	56
4.12	Estudo de genes <i>bla</i> inseridos no cromossomo	57
4.13	Técnica <i>Southern blot</i>	57
4.14	Hibridação do DNA da membrana de nylon com sonda	58
4.15	Classificação das linhagens de <i>E. coli</i> em grupos filogenéticos.....	59
5.	RESULTADOS	61
5.1	Linhagens de <i>Escherichia coli</i> isoladas de carnes e do TGI de frangos no Brasil	61
5.2	Linhagens de <i>Escherichia coli</i> isoladas a partir de carnes de frango e de carnes de coelho na França.....	61
5.3	Tipagem molecular das linhagens de <i>E. coli</i>	61
5.3.1	Tipagem molecular das linhagens isoladas de carnes e do TGI de frangos no Brasil	61
5.3.2	Tipagem molecular por restrição do DNA genômico e MLST das linhagens isoladas de carnes de frango e de carnes de coelho na França.....	63
5.4	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA).....	65
5.4.1	TSA nas linhagens de <i>E. coli</i> isoladas de carnes e do TGI de frangos do Brasil e de carnes de frango da França.....	65
5.4.2	TSA nas linhagens de <i>E. coli</i> isoladas de carnes de coelho da França	69
5.5	Detecção e identificação dos genes de resistência a ESC.....	69
5.5.1	Genes <i>bla</i> nas linhagens de <i>E. coli</i> isoladas de carnes e cloaca de frangos do Brasil	69
5.5.2	Genes <i>bla</i> nas linhagens de <i>E. coli</i> isoladas de carnes de frango e de coelho da França	72
5.6	Ambiente genético dos genes <i>bla</i> e caracterização dos plasmídeos quanto à capacidade de conjugação, ao tamanho e ao grupo de incompatibilidade	74

5.6.1 Contexto genético nas linhagens de <i>E. coli</i> isoladas de carnes e do TGI de frangos do Brasil	74
5.6.2 Contexto genético nas linhagens de <i>E. coli</i> de carnes de frango da França.....	77
5.6.3 Contexto genético nas linhagens de <i>E. coli</i> isoladas a partir de carnes de coelho da França.....	79
5.7 Classificação das linhagens de <i>Escherichia coli</i> em grupos filogenéticos	79
5.7.1 Filogrupo das linhagens de <i>E. coli</i> isoladas de carnes e do TGI de frangos do Brasil	79
5.7.2 Filogrupo das linhagens de <i>E. coli</i> isoladas de carnes de frango e de coelho da França	80
6. DISCUSSÃO.....	82
6.1 Isolamentos de <i>E. coli</i> resistentes a ESC no Brasil e na França	82
6.2 TSA nas linhagens de <i>E. coli</i> resistentes a ESC	84
6.3 Identificação dos genes <i>bla</i> nas linhagens de <i>E. coli</i> resistentes a ESC	86
6.4 Caracterização do contexto genético dos genes <i>bla</i>	92
6.4.1 Contexto genético de <i>bla</i> _{CTX-M-2}	92
6.4.2 Contexto genético de <i>bla</i> _{CTX-M-8}	92
6.4.3 Contexto genético de <i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} e <i>bla</i> _{CTX-M-55}	93
6.4.4 Contexto genético de <i>bla</i> _{TEM-52} , <i>bla</i> _{SHV-12} e <i>bla</i> _{CMY-2}	94
6.5 Classificação das linhagens de <i>E. coli</i> em grupos filogenéticos.....	96
7. CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS	103
APÊNDICE A. Relação dos <i>primers</i> utilizados no presente estudo.	145
APÊNDICE B. Perfil de de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentado pelas linhagens de <i>E. coli</i> isoladas no Brasil incluídas no estudo.....	146
APÊNDICE C. Perfil de de susceptibilidade aos antimicrobianos das <i>E. coli</i> isoladas de carnes de frango na França incluídas no estudo.	148
APÊNDICE D. Perfil de de susceptibilidade aos antimicrobianos das <i>E. coli</i> isoladas de carnes de coelho da França incluídas no estudo.	151
APÊNDICE E. TSA, genes <i>bla</i> e ambiente genético identificados nas cepas transconjugantes de linhagens do Brasil e da França.	152

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*: importância da resistência aos antimicrobianos em saúde pública e na cadeia produtora de alimentos

Escherichia coli é uma espécie bacteriana pertencente à família Enterobacteriaceae (domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem “Enterobacteriales”), descoberta em 1885 pelo médico alemão Theodor Escherich, sendo, à época, denominada *Bacillus coli communne* (Mainil, 2013; PHE, 2015; Shulman, Friedmann e Sims, 2007). São bacilos Gram-negativos amplamente distribuídos na natureza, mesófilos (temperatura ótima de crescimento populacional em torno de 37 °C), pequenos (células com 0,25-1,0 µm de diâmetro por 2,0 µm de comprimento), geralmente, com flagelos peritríquios, não formadores de endósporo. Capazes de utilizar a D-glicose como única fonte de carbono e energia, são anaeróbios facultativos, oxidase-negativos, catalase-positivos, podem fermentar tanto a glicose quanto a lactose, e, neste caso, sempre com produção de ácido e gás, não utilizam citrato como fonte de carbono, produzem indol e reduzem nitratos a nitritos (Brenner e Farmer III, 2005; PHE, 2015).

E. coli é a espécie predominante entre as Enterobacteriaceae encontradas no trato gastrointestinal (TGI) humano e de animais, sendo que vários sorotipos são comensais (Drasar e Hill, 1974). Como parte da microbiota normal, trazem benefícios ao hospedeiro por sintetizarem ácidos graxos, vitaminas K e do complexo B, além de competirem com bactérias patogênicas por sítios de colonização no TGI (Drasar e Hill, 1974).

Entretanto, diversos patótipos apresentam uma combinação de fatores de virulência que lhes permitem causar infecção do TGI (enteropatógenos diarréiogênicos) ou extraintestinais (ExPEC, do inglês *extraintestinal pathogenic E. coli*) (Kaper, Nataro e Mobley, 2004; Newell *et al.*, 2010; Russo e Johnson, 2000). Dentre essas últimas, as *E. coli* causadoras de infecção urinária (UPEC) são grande foco de atenção, pois podem afetar tanto humanos quanto animais (Kaper, Nataro e Mobley, 2004; Stapleton, 2014). Há, também, as *E. coli* patogênicas de aves (APEC), causadoras de colibacilose (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005), por vezes considerada uma causadora de infecção extraintestinal em humanos (Stapleton, 2014). De fato, diversos estudos demonstram a similaridade entre as APEC e as UPEC (Ewers *et al.*, 2007; Johnson, J. R. *et al.*, 2007; Rodriguez-Siek *et al.*, 2005).

A presença de *E. coli* em alimentos indica falhas na higiene durante o processamento e contaminação de origem fecal, sendo que elevadas contagens podem indicar a contaminação

por níveis significativos de outros enteropatógenos (Eisel, Linton e Muriana, 1997; Gill, McGinnis e Badoni, 1996). Tanto patótipos comensais, diarreioogênicos ou ExPEC podem ser transmitidos para o homem através do consumo de carnes (Jakobsen *et al.*, 2010; Jakobsen, Hammerum e Frimodt-Moller, 2010; Kaper, Nataro e Mobley, 2004; Leite e Franco, 2006; Manges *et al.*, 2007; Newell *et al.*, 2010; Pruijboom-Brees *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, tem-se observado o aumento nas taxas de resistência aos antimicrobianos em *E. coli* isoladas de indivíduos com infecções na comunidade e em hospitais (Minarini *et al.*, 2007; Teichmann *et al.*, 2014). Paralelamente, aumentam os relatos do isolamento de *E. coli* virulentas e resistentes aos antimicrobianos a partir de aves e carne de frango (Botelho *et al.*, 2015; Casella *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2009; Koga *et al.*, 2015; Maciucă *et al.*, 2015; Tadesse *et al.*, 2012). Este fato é considerado consequência da seleção de linhagens resistentes no trato gastrointestinal dos animais, devido ao intenso uso de antimicrobianos para o tratamento preventivo ou de infecções, e também como promotores de crescimento (Andersson e Hughes, 2014; McEwen e Fedorka-Cray, 2002; Seiffert *et al.*, 2013; Volkova *et al.*, 2012).

Durante o abate do animal e o processamento para a produção da carne, bactérias resistentes do TGI dos animais podem contaminar a carcaça e, posteriormente, via cadeia alimentar, chegar ao TGI humano (Kilonzo-Nthenge, Rotich e Nahashon, 2013), onde atuam como reservatórios de genes de resistência transmissíveis horizontalmente para a microbiota humana (Capozzi e Spano, 2009), ou disseminam para outros sítios corporais, causando infecções de difícil tratamento (Carattoli, 2008; Prescott, 2008; Price *et al.*, 2007; Ramchandani *et al.*, 2005; Smet *et al.*, 2010; Soulsby, 2007).

Neste contexto, carnes de frango são consideradas potenciais fontes de ExPEC para humanos (Manges *et al.*, 2007; Manges e Johnson, 2012; Mellata, 2013; Mitchell *et al.*, 2015), e a relação epidemiológica entre linhagens resistentes a antimicrobianos isoladas de humanos e de carnes de frango tem sido demonstrada (Belmar Campos *et al.*, 2014; Bergeron *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2006, 2009; Johnson, J. R. *et al.*, 2007; Kluytmans *et al.*, 2013; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Lyhs *et al.*, 2012; Manges *et al.*, 2007; Manges e Johnson, 2012; Poirel, Bonnin e Nordmann, 2012; Ramchandani *et al.*, 2005; Seiffert *et al.*, 2013; Tadesse *et al.*, 2012; Vanni *et al.*, 2014; Vincent *et al.*, 2010).

Diante da possibilidade se carnes serem veículo para a transmissão de UPEC de animais de produção para humanos, foi sugerido que as infecções do trato urinário sejam classificadas como doenças de origem alimentar (Nordstrom, Liu e Price, 2013; Ramchandani *et al.*, 2005) e zoonoses (Jakobsen *et al.*, 2012), mas investigações adicionais são necessárias para

quantificar, com precisão, a sua contribuição a essas infecções. No caso da classificação como doença de origem alimentar, a maior ocorrência das infecções seriam devidas à contaminação de mãos e objetos de cozinha durante o manuseio da carne crua, e posterior contaminação do alimento já preparado, ao invés de uma contaminação direta pelo consumo das carnes cruas, fato muito raro, especialmente tratando-se de carnes de frango.

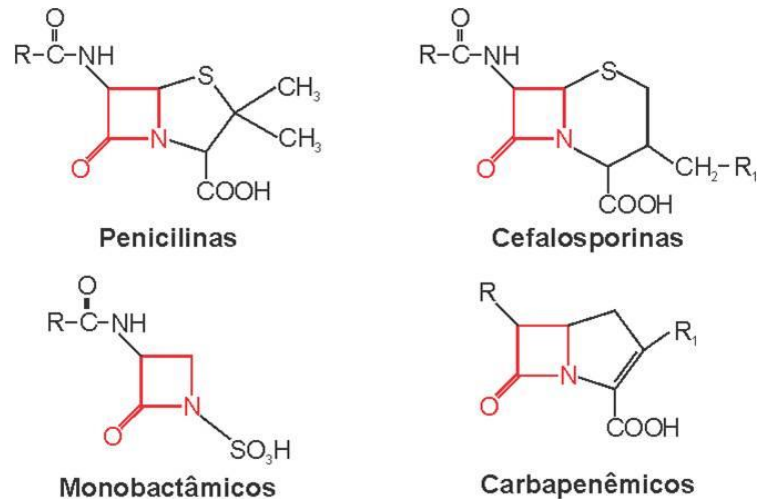
1.2 A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos

Existem quatro principais classes de β -lactâmicos utilizados na clínica humana: Penicilinas, Cefalosporinas, Monobactâmicos e Carbapenêmicos (Schneider e Sahl, 2010). Todos os antimicrobianos β -lactâmicos caracterizam-se por possuírem um anel β -lactâmico (**Figura 1**), cuja estrutura química mimetiza a terminação D-alanina-D-alanina da cadeia lateral pentapeptídica dos blocos de peptidoglicano que formam a parede celular das bactérias (Schneider e Sahl, 2010). Dessa forma, o anel β -lactâmico liga-se às transpeptidases (ou PBP – do inglês, *Penicillin Binding Proteins*), impedindo-as de ligarem-se ao pentapeptídeo e realizarem a ligação cruzada das cadeias de glicano e, assim, estabilizar a estrutura da parede celular. Portanto, é imprescindível que o anel β -lactâmico mantenha-se íntegro para atuar corretamente, cuja desestabilização impede a ligação do antimicrobiano às PBP (Schneider e Sahl, 2010).

Os β -lactâmicos estão entre os principais antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções do trato urinário e infecções por *E. coli* (Gupta *et al.*, 2011). Entretanto, a taxa de resistência a essa classe de antimicrobiano tem aumentado entre as *E. coli* isoladas de pacientes hospitalizados (Bergeron *et al.*, 2012; Manges e Johnson, 2012; Teichmann *et al.*, 2014) e de animais de produção e carnes (Bergeron *et al.*, 2012; Lyhs *et al.*, 2012; Manges *et al.*, 2007; Manges e Johnson, 2012).

A transmissão destas bactérias para o homem através da cadeia alimentar tem sido discutida em vários estudos (Belmar Campos *et al.*, 2014; Carattoli, 2008; Depoorter *et al.*, 2012; Fricke *et al.*, 2009; Harada e Asai, 2010; Kluytmans *et al.*, 2013; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Manges *et al.*, 2007; Overdevest *et al.*, 2011; Poirel, Bonnin e Nordmann, 2012; Seiffert *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2011).

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura química de antimicrobianos β -lactâmicos. A cadeia lateral (R) é variável entre os diferentes β -lactâmicos, bem como o anel de tiazolidina, que também apresenta variações entre as classes desse antimicrobiano, sendo, inclusive, inexistente nos monobactâmicos. O anel β -lactâmico está representado em vermelho. (Imagem do autor)



A resistência aos β -lactâmicos é um importante desafio para a medicina, pois estes antimicrobianos, principalmente as cefalosporinas de espectro estendido (ESC) – de terceira e quarta gerações – e os carbapenêmicos, constituem as principais escolhas terapêuticas para o tratamento de infecções graves (Coque, Baquero e Cantón, 2008). De fato, os β -lactâmicos são antimicrobianos considerados “criticamente importantes”, tanto em medicina humana quanto veterinária, pela Organização Mundial de Saúde e pela Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE, 2014; WHO, 2012a). Isso significa que eles podem representar a única opção, ou estar entre um grupo limitado de opções disponíveis, para o tratamento de infecções humanas graves, de infecções por microrganismos que podem ser transmitidos para humanos a partir de fontes não humanas, ou que possam adquirir genes de resistência de fontes não humanas (WHO, 2012a).

A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos ocorre por diversos mecanismos. A produção de enzimas β -lactamases é o principal mecanismo em Enterobacteriaceae, que desestruturam o anel β -lactâmico, impedindo que o antimicrobiano se ligue às PBP (Bush, 2010).

As β -lactamases são classificadas por dois principais critérios, baseado na estrutura molecular da enzima (Ambler, 1980) ou em características enzimáticas (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995). A classificação de Ambler divide as β -lactamases nas classes A a D, sendo que as pertencentes às classes A, C e D são serina- β -lactamases, pois possuem o aminoácido serina no centro ativo da enzima, e as enzimas pertencentes à classe B são metalo- β -lactamases,

pois são dependentes de íons Zn^{+2} como cofator para sua atividade (Ambler, 1980). Já a classificação de Bush-Jacob-Medeiros estabelece os grupos de 1 a 4, com subdivisões, segundo o substrato da enzima e o perfil de inibição por inibidores de β -lactamases (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995).

1.2.1 As β -lactamases do tipo AmpC

As β -lactamases do tipo AmpC são enzimas do grupo 1 de Bush-Jacoby-Medeiros e da classe C de Ambler (Ambler, 1980; Bush, Jacoby e Medeiros, 1995). Em diversas espécies de Enterobacteriaceae, como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp. e *Shigella* spp., essas enzimas são codificadas por genes cromossômicos, sendo sua hiperprodução induzível pela exposição a β -lactâmicos (Bret *et al.*, 1998; Coudron, Moland e Thomson, 2000; Hanson, 2003; Jacoby, 2009; Paterson, 2006; Pérez-Pérez e Hanson, 2002; Yagi *et al.*, 2005). Por exemplo, em *E. coli* ocorre produção constante de AmpC em baixos níveis, provavelmente pela presença de um fraco promotor do gene (Bonomo e Tolmasky, 2007). Entretanto, as variantes codificadas por genes localizados em plasmídeos ganharam maior importância, e estas têm sido detectadas mundialmente em diversas espécies de Enterobacteriaceae não reconhecidas anteriormente por hiperproduzirem-nas (Doi e Paterson, 2007).

As principais AmpC plasmidiais (pAmpC) são CMY, MIR, MOX, LAT, FOX, DHA, ACT, ACC e CFE (Jacoby, 2009). Salvo raras exceções (como CMY-37), quando hiperproduzidas, essas enzimas são capazes de hidrolisar todas as penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, cefamicinas e o aztreonam, e não são suscetíveis aos inibidores das β -lactamases (Bush, 2001). A variante CMY-37 sempre apresenta atividade contra ESC, mesmo quando produzida em pequenas quantidades. Entre todas as pAmpC, CMY é a mais amplamente disseminada, sendo que *E. coli* produtoras de CMY são, frequentemente, isoladas de carnes frescas comercializadas nos EUA (Mollenkopf *et al.*, 2011), e esta enzima é um dos mais importantes determinantes de resistência às cefalosporinas em Enterobacteriaceae isoladas de animais de produção (Rubin e Pitout, 2014; Zioga *et al.*, 2008).

Há poucos anos, CMY-2 foi detectada em um clone de *Salmonella* Typhimurium produtor de OXA-30 relacionado a surtos de infecção alimentar na Europa (Antunes, Coque e Peixe, 2010), e a disseminação de um plasmídeo carreador de CMY-2 entre *E. coli* e *S. enterica* isoladas de diversas fontes foi descrita no Canadá (Mataseje *et al.*, 2010). Um estudo com carnes de frango importadas para a Suécia detectou linhagens de *E. coli* carreadoras de *bla*_{CMY}.

2 em carnes importadas, principalmente, de países europeus, como Alemanha, Dinamarca e Finlândia, mas também de países da América do Sul, como Argentina e Chile (Egervärn *et al.*, 2014). Dhanji e colaboradores isolaram linhagens de *E. coli* produtoras de β -lactamases CMY a partir de carnes de frango importadas de países da América do Sul para o Reino Unido, mas não especificam se dentre elas estavam amostras de carnes do Brasil (Dhanji *et al.*, 2010).

No Brasil, já foram isoladas linhagens de *E. coli* e de *K. pneumoniae* produtoras de CMY-2 a partir de amostras clínicas na cidade de São Paulo (Campana *et al.*, 2013; Pavez *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2016). Quanto a estudos com animais de produção no país, é relatado o isolamento de uma *E. coli* produtora de CMY-2 a partir de fezes em rebanho de búfalos confinados para a produção de leite no Paraná (Aizawa *et al.*, 2014), e a presença de *Salmonella enterica* carreadoras de genes *bla*_{CMY} na cadeia produtora de frangos no Rio Grande do Sul (Mattiello *et al.*, 2015).

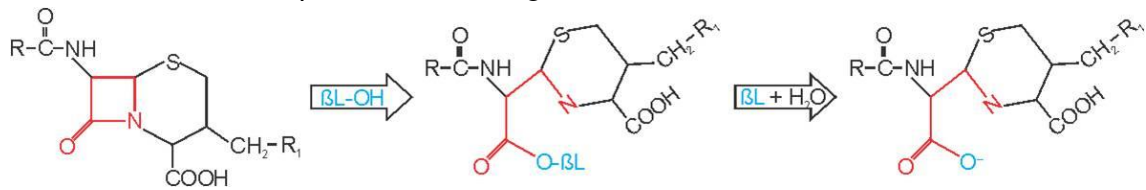
1.2.2 As β -lactamases de espectro estendido

A produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) é o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em *E. coli* (Abreu *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2012; Kassakian e Mermel, 2014; MacVane, Tuttle e Nicolau, 2014; Minarini *et al.*, 2009; Thiebaut *et al.*, 2012). Essas enzimas inativam penicilinas, cefalosporinas de terceira e quarta geração e o aztreonam, mas não cefamicinas, e são inibidas pelo ácido clavulânico; são, portanto, responsáveis por grande parte de falhas nos tratamentos com ESC (Gutkind *et al.*, 2013).

As ESBL são enzimas da classe A de Ambler e grupo 2be de Bush-Jacoby-Medeiros (Ambler, 1980; Bush, Jacoby e Medeiros, 1995), capazes de hidrolisar os β -lactâmicos pela hidroxilação irreversível da ligação amida do anel β -lactâmico, impedindo a ligação deste às PBP (Bertrand *et al.*, 2006; Bush, 2001; Bush, Jacoby e Medeiros, 1995; Paterson e Bonomo, 2005), como esquematizado na **Figura 2**.

Atualmente, as ESBL estão entre as enzimas mais comumente descritas em Enterobacteriaceae isoladas de animais de produção e, conseqüentemente, de carnes (Nüesch-Inderbinen e Stephan, 2016; Smet *et al.*, 2010). No Brasil, β -lactâmicos são usados na avicultura para o tratamento de diversas infecções (Mendes *et al.*, 2013), o que pode resultar na seleção de Enterobacteriaceae resistentes no TGI destes animais.

Figura 2 – Esquema simplificado da ação inibitória irreversível de enzimas β -lactamases (BL) sobre um antimicrobiano β -lactâmico. (Imagem do autor)



Em contraste com bactérias resistentes a outros tipos de antimicrobianos, acredita-se que a resistência mediada pela produção de ESBL tenha se difundido, principalmente, por toda a comunidade, e não apenas nas instituições de assistência à saúde (Leistner *et al.*, 2013). A colonização de humanos por bactérias produtoras de ESBL tem sido associada a fatos que sugerem sua fonte como sendo de origem alimentar (Abreu *et al.*, 2014).

De fato, as principais ESBL encontradas em *E. coli* isoladas de humanos são as mesmas produzidas por *E. coli* isoladas de animais de produção (Egea *et al.*, 2012; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Este fato ilustra o movimento dos genes de resistência de animais para seres humanos ou vice-versa (Bertrand *et al.*, 2006; Cloeckert *et al.*, 2007; Hernandez *et al.*, 2005).

Diversas famílias de ESBL já foram descritas (TEM, SHV, CTX-M, SFO, BES, BEL, TLA, GES, PER e VEB) (Bush, Palzkill e Jacoby, 2015). Atualmente, as CTX-M são o tipo mais prevalente e encontram-se disseminadas mundialmente (Cantón, González-Alba e Galán, 2012; Paterson e Bonomo, 2005; Pitout, 2008; Talbot *et al.*, 2006). Essas enzimas têm sido relacionadas, com bastante frequência, em *E. coli* isoladas de humanos e de animais de produção (Bonnet, 2004; Egervärn *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2014a; b, 2016; Fischer *et al.*, 2014; Geser, Stephan e Hächler, 2012; Grami *et al.*, 2013, 2014; Hawkey, 2008; Huijbers *et al.*, 2016; Lahlaoui, Haj Khalifa, Ben e Moussa, Ben, 2014; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Michael *et al.*, 2016; Naas, Poirel e Nordmann, 2008; Olsen *et al.*, 2014; Sidjabat e Paterson, 2015; Smet *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013; Woerther *et al.*, 2013; Zurfluh *et al.*, 2016).

Com relação a outras ESBL, na Alemanha e na Holanda, dois estudos independentes isolaram *E. coli* produtoras de SHV-2, SHV-12 e TEM-52 a partir de carnes de frango (Cohen Stuart *et al.*, 2012; Kola *et al.*, 2012). Na Espanha, Ojer-Usoz e colaboradores isolaram *E. coli* produtoras de SHV-12 de carnes do varejo (Ojer-Usoz *et al.*, 2013). Ainda na Espanha, identificou-se SHV-12 como a ESBL mais frequente em carnes de frango e de peru, estando, também, bastante disseminada entre as *E. coli* causadoras de infecções comunitárias e nosocomiais no país (Egea *et al.*, 2012). Também, ESBL do tipo TEM e SHV foram detectadas em frangos aparentemente saudáveis (Olsen *et al.*, 2014). Diversos outros estudos apontam a

presença de TEM-52, TEM-126 e SHV-12 em Enterobacteriaceae isoladas de aves de produção na Europa (Briñas *et al.*, 2003; Cloeckeaert *et al.*, 2007; Geser, Stephan e Hächler, 2012; Hasman *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2008; Riaño *et al.*, 2006; Smet *et al.*, 2008).

1.2.3 As enzimas CTX-M

As enzimas CTX-M receberam este nome devido à sua atividade de “cefotaximase”, ou seja, degradam a cefotaxima (um β -lactâmico cefalosporina de terceira geração), e por terem sido detectadas, pela primeira vez, em Munique, na Alemanha, em 1989 (Bauernfeind, Grimm e Schweighart, 1990). Diferentemente de enzimas TEM e SHV, todas as CTX-M têm perfil de ESBL (Zhao e Hu, 2013). Essa família de enzimas tem, como origem, genes de cefotaximases intrínsecos, ou seja, codificados por genes cromossômicos, em *Kluyvera* spp., um gênero de Enterobacteriaceae encontrado no solo, ambientes ou como comensais (Rodríguez *et al.*, 2007; Zhao e Hu, 2013). A maioria das CTX-M apresenta atividade contra a cefotaxima e a ceftriaxona, mas não contra a ceftazidima; entretanto, algumas CTX-M exibem eficiência elevada contra a ceftazidima (Bonnet *et al.*, 2001; Poirel *et al.*, 2001; Poirel, Gniadkowski e Nordmann, 2002; Zhao e Hu, 2013).

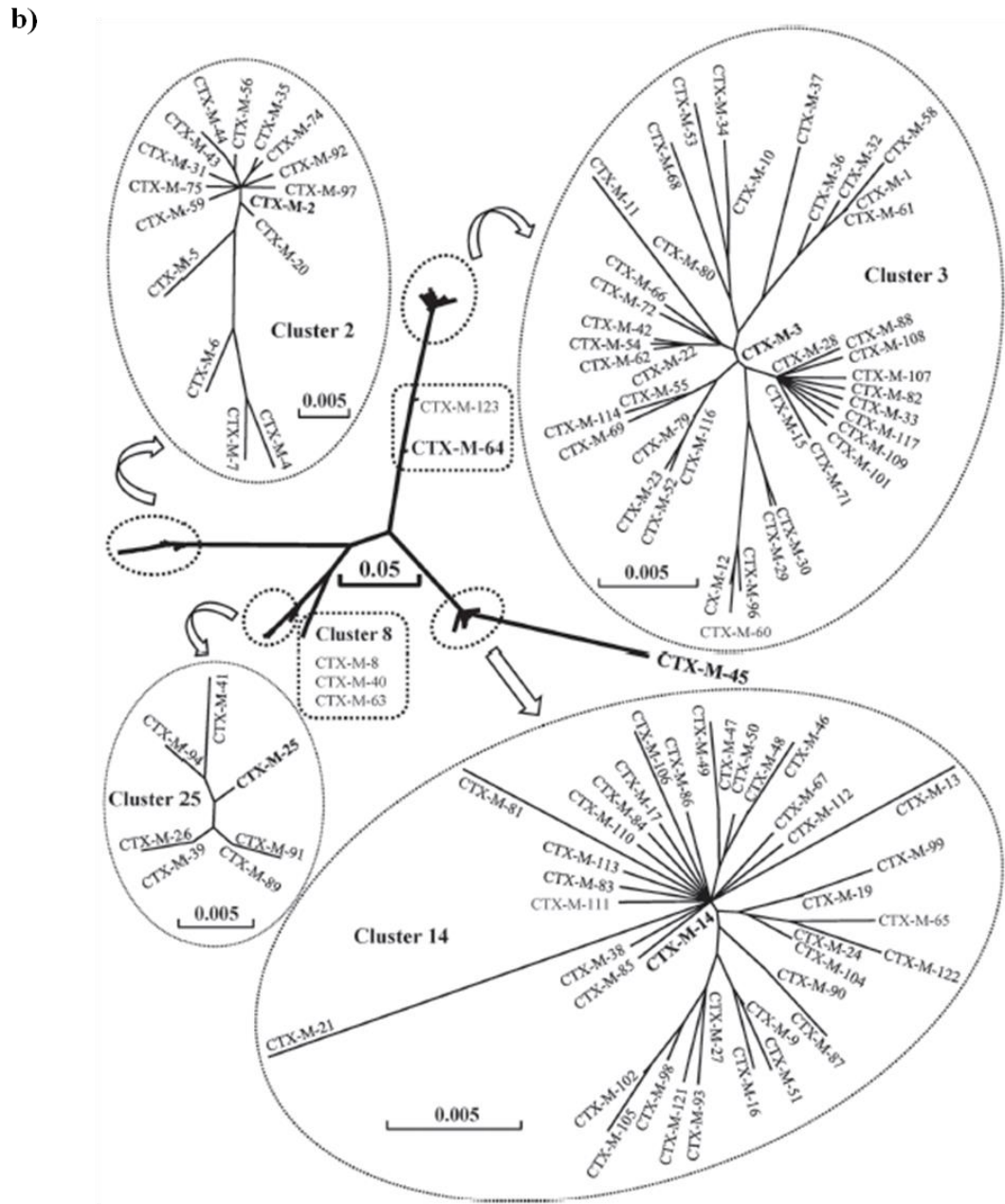
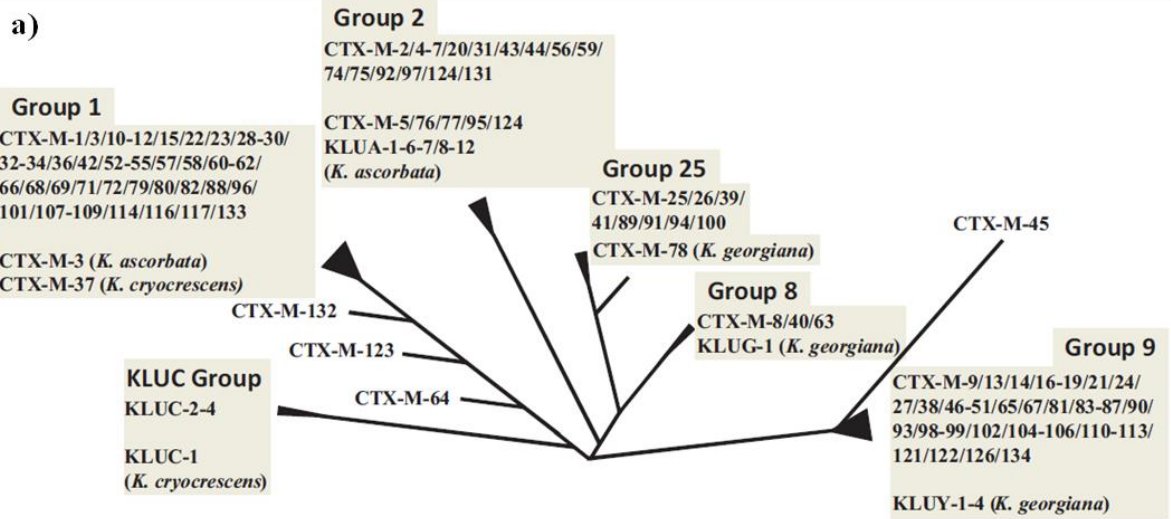
Atualmente, o número de variantes de CTX-M e de organismos carreadores dos genes tem aumentado drasticamente, tendo sido identificadas 174 variantes da enzima (de CTX-M-1 à CTX-M-182), de acordo com última atualização do site que, atualmente, gere esses dados (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>). O número de variantes não corresponde ao de “nomes” das enzimas por dois motivos: *i*) as sequências de aminoácidos de CTX-M-14 e CTX-M-18, CTX-M-55 e CTX-M-57, CTX-M-2 e CTX-M-97, e CTX-M-3 e CTX-M-133 são idênticas (Bush, Palzkill e Jacoby, 2015), e *ii*) as enzimas CTX-M-76, CTX-M-77, CTX-M-78 e CTX-M-95 são cefotaximases intrínsecas codificadas no cromossomo de *Kluyvera* spp., e, portanto, não são consideradas como pertencentes à família CTX-M (Zhao e Hu, 2013). CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-15, CTX-M-25 e CTX-M-37 são exemplos de enzimas geralmente mediadas por plasmídeos que também já foram detectadas no cromossomo de Enterobacteriaceae, em um movimento chamado de “integração cromossômica secundária” (Ferreira *et al.*, 2014b; Garcia *et al.*, 2005; Harada *et al.*, 2012; Mshana *et al.*, 2015; Navon-Venezia *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2011; Zhao e Hu, 2013).

Baseado na árvore filogenética das sequências de aminoácidos, as enzimas da família CTX-M são divididas em seis ou sete grupos (de acordo com a classificação), cuja diferença entre os grupos é $\geq 10\%$ de resíduos de aminoácidos e, dentro de cada grupo, a diferença dos

resíduos é $\leq 5\%$ entre as enzimas (D'Andrea *et al.*, 2013; Zhao e Hu, 2013). Atualmente, duas classificações dos grupos de CTX-M divergem ligeiramente (**Figura 3**). De acordo com D'Andrea e colaboradores, que distribuem as CTX-M em seis grupos, estes são nomeados de acordo com a “enzima tipo” de cada grupo: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 e KLUC, com as enzimas CTX-M-45, CTX-M-64, CTX-M-123 e CTX-M-132 deixadas de fora dos grupos por serem variantes que exibem uma estrutura híbrida entre duas enzimas (D'Andrea *et al.*, 2013). Já Zhao e Hu distribuem as CTX-M em sete grupos, de acordo com a enzima que aparece na posição central na árvore filogenética de cada grupo: CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-8, CTX-M-14, CTX-M-25, CTX-M-45 e CTX-M-64 (Zhao e Hu, 2013).

Em relação à presença das enzimas CTX-M na cadeia de produção animal, publicações demonstram a importância de manter estudos de vigilância neste setor em todo o mundo. *E. coli* produtoras de CTX-M têm sido detectadas em carnes e no TGI de animais, inclusive no Brasil (Botelho *et al.*, 2015; Carattoli, 2008, 2013; Casella *et al.*, 2015; Dhanji *et al.*, 2010; Egervärn *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2014a; b, 2016; Fischer *et al.*, 2014; Geser, Stephan e Hächler, 2012; Grami *et al.*, 2013; Madec *et al.*, 2008, 2012; Smet *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2009; Warren *et al.*, 2008). Linhagens de *E. coli* produtoras de CTX-M-2, uma ESBL endêmica no Brasil (Minarini *et al.*, 2009; Rocha, Pinto e Barbosa, 2016; Tollentino *et al.*, 2011), foram isoladas de peitos de frango importados do Brasil para o Reino Unido e para a Suécia (Dhanji *et al.*, 2010; Egervärn *et al.*, 2014; Warren *et al.*, 2008). Na Tunísia, *E. coli* carreadoras de *bla*_{CTX-M-1} foram isoladas de frangos, onde uma importante parcela da população é colonizada por estas bactérias (Grami *et al.*, 2013). Na Holanda, *E. coli* carreadoras do gene *bla*_{CTX-M-1} foram detectadas em humanos, aves domésticas e carnes de frango (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Overdeest *et al.*, 2011). Em um estudo subsequente, os pesquisadores holandeses observaram grande similaridade genética entre as *E. coli* isoladas das diferentes fontes, sugerindo que a presença de genes de ESBL na cadeia alimentar pode exercer um importante efeito sobre a eficiência do tratamento de infecções (Kluytmans *et al.*, 2013).

Figura 3 – Árvores filogenéticas da família CTX-M criadas a partir de duas classificações distintas. **a)** A classificação de D'Andrea e colaboradores distribue as CTX-M em seis grupos, nomeados de acordo com a “enzima tipo” de cada um; o tamanho dos triângulos no final de cada braço da árvore reflete o número de variantes alélicas dentro de cada grupo (D'Andrea *et al.*, 2013). **b)** A classificação de Zhao e Hu distribue as CTX-M em sete grupos, nomeados de acordo com a enzima que aparece na posição central de cada grupo na árvore filogenética; os tamanhos dos braços da árvore foram desenhados em escala e são proporcionais à quantidade de diferenças entre os resíduos de aminoácidos. As barras de escala de 0,05 e 0,005 representam 5% e 0,5% na diferença de resíduos, respectivamente (Zhao e Hu, 2013).



Recentemente, Geser e colaboradores descreveram o papel de animais de produção como reservatórios de Enterobacteriaceae produtoras de CTX-M (Geser, Stephan e Hächler, 2012), e diversos estudos relatam o isolamento destas bactérias a partir de amostras de carnes. Na França, *Salmonella* Virchow produtora de CTX-M-9 foi isolada de animais de produção e, posteriormente, de fezes de uma criança com gastroenterite (Weill *et al.*, 2004). Riaño e colaboradores descreveram o isolamento de linhagens produtoras de CTX-M-9 a partir de carcaças de frango na Espanha, onde esta enzima era também prevalente em linhagens isoladas de humanos (Riaño *et al.*, 2006). A enzima CTX-M-15, a mais disseminada entre as Enterobacteriaceae isoladas de humanos, também já foi detectada em *E. coli* isoladas de aves domésticas, na Bélgica (Smet *et al.*, 2008), e suínos, na China (Tian *et al.*, 2009).

Dois estudos no Reino Unido relataram que peitos de frango importados do Brasil continham *E. coli* produtoras de CTX-M-2 (Dhanji *et al.*, 2010; Warren *et al.*, 2008), uma ESBL comumente detectada em hospitais brasileiros (Minarini *et al.*, 2009; Rocha, Pinto e Barbosa, 2016; Tollentino *et al.*, 2011), além de CTX-M-8 (Dhanji *et al.*, 2010). Alguns anos mais tarde, novamente, a carne de frango produzida no Brasil, desta vez exportada para a Suécia, foi colocada em evidência, por conter *E. coli* carreadoras de *bla*_{CTX-M-2} ou *bla*_{CTX-M-8} (Egervärn *et al.*, 2014). Ainda, no Brasil, a produção de CTX-M-2 por *E. coli* e *Salmonella* Typhimurium isoladas de frango e seu ambiente foi relatada (Fernandes *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2014b, 2016). Além disso, em um outro estudo no país, com *Salmonella enterica* isoladas de amostras clínicas humanas, animais, ração animal e alimentos, foram identificados genes codificadores de CTX-M-8 e CTX-M-9 (Peirano *et al.*, 2006). Recentemente, estudos descreveram o isolamento de linhagens de Enterobacteriaceae carreadoras de *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8} ou *bla*_{CTX-M-15} em carnes de frango no Brasil (Botelho *et al.*, 2015; Casella *et al.*, 2015; Koga *et al.*, 2015).

1.3 Ambiente genético de *bla*_{CTX-M} e sua mobilização

Diversos relatos do aparecimento repentino das mesmas enzimas em países distantes, não somente em espécies de Enterobacteriaceae, suscitou a ideia de emergência independente dessas enzimas, bem como a de uma disseminação extremamente rápida (Cantón, González-Alba e Galán, 2012). Foi, então, proposto que diversos fatores podem influenciar a emergência, a manutenção e a disseminação das CTX-M no mundo, sendo a utilização prévia de antimicrobianos e a internação em instituições de assistência à saúde, bem como fatores ambientais, apenas algumas das explicações para esse fenômeno (Cantón, González-Alba e Galán, 2012). Outros fatores mais intimamente relacionados à globalização dessas enzimas

seriam a ligação dos genes *bla*_{CTX-M} a plataformas genéticas altamente móveis, como plasmídeos conjugativos, transposons, sequências de inserção, integrons e, mais raramente, a elementos relacionados a bacteriófagos, além de, também, esses elementos genéticos estarem relacionados a clones bacterianos que apresentam grande sucesso na sua disseminação, como nos casos da *E. coli* ST131 e da *Klebsiella pneumoniae* ST258 (Barlow *et al.*, 2008; Cantón e Coque, 2006; Cantón, González-Alba e Galán, 2012; Carattoli, 2001, 2009; D'Andrea *et al.*, 2013; Oliver *et al.*, 2005; Zhao e Hu, 2013).

As sequências de inserção (IS) desempenham três funções básicas na bactéria: *i*) codificam a transposase, responsável pela mobilidade de um elemento genético, *ii*) fornecem promotores que ativam genes silenciados ou aumentam a expressão de genes *downstream* a elas, e *iii*) movem os genes ligados a elas entre integrons, transposons, plasmídeos e cromossomos, aumentando, assim, a oportunidade de um gene de resistência em se tornar transferível (Zhao e Hu, 2013). Algumas IS, como a *ISCR1*, estão adjacentes a estruturas de integrons, que estão, também, integrados em unidades maiores de transposição (Cantón, González-Alba e Galán, 2012). Algumas dessas unidades de transposição carregam genes de resistência a outras classes de antimicrobianos, o que pode, também, favorecer a manutenção dos *bla*_{CTX-M} na população por processos de co-seleção (Cantón, González-Alba e Galán, 2012).

Têm sido descrito novos arranjos genéticos associados aos genes *bla*_{CTX-M}, que, segundo análises adicionais, seriam variações de algumas estruturas genéticas (Dhanji *et al.*, 2011; Eckert, Gautier e Arlet, 2006; Lartigue, Poirel e Nordmann, 2004; Toleman e Walsh, 2011). Lartigue e colaboradores demonstraram experimentalmente a mobilização de *bla*_{CTX-M} localizado *downstream* à *ISEcp1* (Lartigue *et al.*, 2006). Como as IS fornecem um forte promotor para a expressão do gene que as acompanha, os estudos tentam desvendar a região *upstream* dos *bla*_{CTX-M}, enquanto pouco se sabe sobre a região *downstream* desses genes (Cantón, González-Alba e Galán, 2012). As principais IS identificadas ligadas a genes *bla*_{CTX-M} são *ISEcp1*, *ISCR1*, *IS10* e *IS26*, com destaque para as duas primeiras (Cantón, González-Alba e Galán, 2012; D'Andrea *et al.*, 2013; Zhao e Hu, 2013).

Como dito anteriormente, o movimento de genes mobilizados entre cromossomos e plasmídeos pelas IS potencializa a oportunidade de um determinante de resistência se tornar transferível. Plasmídeos conjugativos representam um dos mais importantes mecanismos de transferência de genes entre organismos de uma mesma espécie, entre espécies diferentes e, até mesmo, entre gêneros diferentes (Zhao e Hu, 2013).

1.3.1 Plasmídeos: características e associação com *bla*_{CTX-M}

Plasmídeos são, normalmente, classificados pelo seu grupo de incompatibilidade (Inc), definido como a incapacidade de dois plasmídeos de um mesmo Inc permanecerem estáveis dentro de uma mesma célula bacteriana (Novick, 1987; Novick *et al.*, 1976). Os grupos de incompatibilidade são definidos de acordo com o *replicon* básico de um plasmídeo. A replicação autônoma dos plasmídeos é controlada por ele próprio, e determina o seu número de cópias dentro da célula hospedeira. Os genes e sítios relacionados à replicação autônoma (dentre eles, genes *rep*, que codificam proteínas necessárias ao controle da replicação) constituem o *replicon* básico de um plasmídeo (Couturier *et al.*, 1988).

São conhecidos 29 grupos de incompatibilidade entre os plasmídeos de Enterobacteriaceae: IncA/C, IncB, IncD, família IncF (de I a VI), família IncHI (1, 2 e 3), família IncI (1,2 e γ), IncJ, IncK, IncL/M, IncN, IncO, IncP, IncS, IncT, IncU, IncV, IncW, IncX, IncY e com9; porém, A/C, B/O, família FI (A, B e C), FII, HI1, HI2, I1, K, L/M, N, P, T, W, X (1 a 4) e Y são os principais (Carattoli, 2009; Couturier *et al.*, 1988; Novick *et al.*, 1976; Zhao e Hu, 2013).

Por vezes, a definição do Inc de um plasmídeo torna-se dificultada devido à presença de mais de um *replicon* em um mesmo plasmídeo (Couturier *et al.*, 1988). Essas quimeras de plasmídeos, também chamados de plasmídeos “multirreplicons” ou “híbridos”, são formadas pela recombinação de dois plasmídeos distintos de organismos originalmente incapazes de trocar elementos genéticos (Novick, 1987). A presença de mais de um *replicon* em um plasmídeo pode favorecer o processo evolutivo dele, permitindo que um *replicon* divirja e, eventualmente, produza um *replicon* com novas especificidades e funcionalidades (Ouazzani Chahdi, Gabant e Couturier, 1997). Quando uma célula hospedeira contendo um plasmídeo multirreplicon adquire um novo plasmídeo, contendo um dos *replicons* já presente no plasmídeo multirreplicon, este não será expulso da célula, porque a presença do segundo *replicon* funcional no plasmídeo multirreplicon toma o controle da replicação, impedindo que seja expulso da célula (Couturier *et al.*, 1988).

Plasmídeos multirreplicons são bastante comuns na família F (Couturier *et al.*, 1988), mas outras combinações já foram detectadas, como um plasmídeo híbrido IncA/C e IncR em uma *Providencia stuartii* isolada de um paciente na Grécia (Drieux *et al.*, 2013), um plasmídeo multireplicon IncN/F em uma *E. coli* isolada de fezes de suínos na Suíça (Zurfluh, Jakobi, *et al.*, 2014), e plasmídeos híbridos HI2/P em linhagens de *E. coli* e *Salmonella* de aves de corte na Bélgica e na Holanda (Dierikx *et al.*, 2010; Doublet *et al.*, 2014).

Plasmídeos também desempenham um papel extremamente importante para a disseminação de genes *bla*_{CTX-M}. Por exemplo, a disseminação mundial de *bla*_{CTX-M-15} está, principalmente, associada a plasmídeos do grupo de incompatibilidade FII (Coque *et al.*, 2008), um tipo de plasmídeo muito associado às Enterobacteriaceae, apesar de não abrangerem uma grande gama de hospedeiros, e apresentam pequena quantidade de cópias dentro da bactéria (Carattoli, 2011). Por outro lado, plasmídeos que abrangem uma grande quantidade de hospedeiros distintos, como IncN, IncII e IncL/M, também estão relacionados à disseminação de *bla*_{CTX-M} (Cantón, González-Alba e Galán, 2012; Carattoli, 2013). Muitos deles parecem ter seus reservatórios em animais, uma vez que foram detectados em bactérias isoladas a partir de animais de produção (Carattoli, 2011, 2013). Isso mostra a habilidade desses plasmídeos em recrutar genes de resistência, assim, aumentando suas prevalência e persistência nas bactérias (Cantón, González-Alba e Galán, 2012).

Plasmídeos IncA/C, IncFII, IncII e IncL/M são considerados “pandêmicos”, uma vez que são detectados em diferentes países e em diferentes bactérias de fontes e origens distintas. Sua ocorrência parece estar fortemente ligada à seleção positiva exercida pelo uso de antimicrobianos, com prevalência aumentada quando comparada ao observado em populações bacterianas que não foram previamente selecionadas (Johnson, T. J. *et al.*, 2007; Lindsey *et al.*, 2009; Sherley, Gordon e Collignon, 2003).

1.3.2 Tamanho molecular dos plasmídeos de resistência

Outra característica dos plasmídeos que portam genes de resistência, estudada conjuntamente aos grupos de incompatibilidade, é o seu tamanho molecular. Plasmídeos de tamanho molecular muito elevado (a partir de, aproximadamente, 100 kb) não se separam facilmente do DNA cromossômico quando submetidos à eletroforese convencional (somente uma direção de campo elétrico). Sua forma circular fechada superenovelada migra muito lentamente na eletroforese em gel em campo pulsado – PFGE (direções alternadas de campo elétrico), e as formas circulares, tanto a “relaxada” quanto a “aberta em um ponto de quebra” (do inglês, *nicked open-circular*), permanecem presas nos plugues das amostras. Assim, somente as formas lineares migram precisamente de acordo com o seu tamanho, podendo-se comparar a uma escala de tamanho molecular padrão (Barton, Harding e Zuccarelli, 1995).

A nuclease S1, extraída de *Aspergillus oryzae*, é a única enzima eficaz contra plasmídeos na forma superenovelada, pois possui uma ação autolimitada e gera poucos cortes no DNA cromossômico. Essas características são consequências da sua especificidade por

ácidos nucleicos não pareados. Em plasmídeos superenovelados negativamente, regiões transitoriamente desnaturadas sensíveis à ação da S1 ocorrem como resultado da tensão de torção na molécula. Depois que uma fita é cortada, a enzima S1 pode clivar a fita intacta oposta à quebra inicial devido à falta de terminações no ponto de quebra onde a atividade de reparação de emparelhamento de bases é diminuída (Germond, Vogt e Hirt, 1974). Sob essas condições, a enzima tem pouca atividade em DNA fita dupla linear, mas consegue converter plasmídeos em moléculas lineares. A nuclease S1, provavelmente, corta domínios superenovelados no DNA cromossômico, mas as clivagens são muito raras, e produz, relativamente, poucos fragmentos. Consequentemente, plasmídeos linearizados, com uma única cópia, são detectáveis após eletroforese como bandas em um fundo fraco de DNA cromossômico clivado (Barton, Harding e Zuccarelli, 1995). Portanto, a enzima S1 é utilizada consensualmente no estudo do tamanho dos plasmídeos portadores de genes de resistência nas bactérias.

1.3.3 Genes de localização cromossômica

Muitos genes de ESBL plasmidiais tiveram sua origem no cromossomo de um outro microrganismo, o que não é diferente para *bla*_{CTX-M} (Rodríguez *et al.*, 2007), e a sua reinserção no cromossomo bacteriano pode ocorrer por “integração cromossômica secundária”, principalmente mediado por transposons (Zhao e Hu, 2013).

Para estudar a localização cromossômica dos genes de resistência, utiliza-se a enzima I-*CeuI*, isolada de *Chlamydomonas eugametos*, cujo sítio de restrição no DNA refere-se a uma sequência de 26 nucleotídeos, diferentemente das enzimas de restrição convencionais, com sítio de restrição de 6 nucleotídeos (Liu, Hessel e Sanderson, 1993). A enzima I-*CeuI* reconhece seu sítio de restrição apenas nos (geralmente, sete) genes *rrn*, que constituem o RNA ribossômico (rRNA) e, dessa forma, o cromossomo bacteriano é clivado em (sete) fragmentos, que variam de tamanho de acordo com as variações cromossômicas de cada linhagem (Liu, Hessel e Sanderson, 1993). Com isso, genes de localização cromossômica são detectados em um dos fragmentos gerados após restrição com I-*CeuI*.

1.4 Classificação de *E. coli* em grupos filogenéticos

A espécie *Escherichia coli* compreende linhagens comensais que habitam o intestino de muitos animais, incluindo frangos e humanos, e linhagens, como *E. coli* diarreiogênicas e ExPEC, que podem causar uma grande variedade de doenças (Clermont, Bonacorsi e Bingen,

2000; Pasquali *et al.*, 2015). Análises filogenéticas de diversas *E. coli* mostraram que as linhagens estão distribuídas em quatro principais grupos, os grupos filogenéticos (ou “filogrupos”) A, B1, B2 e D (Doumith *et al.*, 2012), baseado na presença ou ausência dos genes *chuA* e *yjaA*, e do fragmento de DNA TspE4.C2 (Clermont, Bonacorsi e Bingen, 2000). O gene *chuA* codifica uma proteína que auxilia no processo de transporte de grupos heme em EHEC O157:H7, enquanto que a função do gene *yjaA* ainda é desconhecida (Clermont, Bonacorsi e Bingen, 2000). O fragmento TspE4.C2 foi caracterizado como possível codificador de uma esterase-lipase (Clermont *et al.*, 2013).

As análises filogenéticas também demonstraram que linhagens que causam infecções extraintestinais pertencem, principalmente, ao filogrupo B2, e em menor quantidade, ao filogrupo D, enquanto que a maioria das linhagens comensais pertence ao filogrupo A (Clermont *et al.*, 2013; Clermont, Bonacorsi e Bingen, 2000). Linhagens dos grupos filogenéticos B2 e D frequentemente carregam determinantes de virulência ausentes em linhagens dos filogrupos A e B1 (Valentin *et al.*, 2014).

Diversos estudos mostram a variação de predominância dos filogrupos de *E. coli* isoladas a partir de carnes ou carcaças de frangos e das aves vivas. Estudos com carnes de aves apresentaram prevalência do grupo filogenético B1, na Itália (Ghodousi *et al.*, 2015), do filogrupo A, na Espanha (Egea *et al.*, 2012), e do filogrupo D, na Finlândia (Lyhs *et al.*, 2012). Estudos com carcaças de frango apresentaram prevalência do filogrupo A, na China (Xu *et al.*, 2014), e de B1, no Brasil (Koga *et al.*, 2015). Já Huijbers e colaboradores detectaram prevalência dos grupos filogenéticos D e A em amostras de cloaca de frangos de corte na Holanda (Huijbers *et al.*, 2014). Com exceção do estudo de Xu e colaboradores citado, todos os demais apresentaram uma taxa bastante baixa do filogrupo patogênico B2 entre as amostras.

Em relação às *E. coli* isoladas de aves de corte, diferentemente das associadas a humanos, não há um consenso na associação entre o grupo filogenético e a capacidade de causar infecções, sendo que diferentes estudos com APEC relatam resultados variados, por vezes, relacionando os filogrupos com determinados sorotipos (Pasquali *et al.*, 2015).

1.5 Tipagem molecular de *Escherichia coli*

A principal função da tipagem molecular é a determinação da relação entre clones de microrganismos de uma mesma espécie. Atualmente, várias técnicas baseadas na análise do DNA estão padronizadas. Entre elas, a PFGE (do inglês, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) e a MLST (do inglês, *Multilocus Sequence Typing*) têm sido amplamente utilizadas, permitindo a

identificação de fontes e rotas de infecção e o reconhecimento de linhagens virulentas (Ranjbar *et al.*, 2014).

A PFGE é um método com alta capacidade discriminatória, baseado na comparação do padrão de bandas após eletroforese em campo elétrico pulsado, que correspondem a grandes fragmentos do genoma obtidos após a digestão com enzimas de restrição (Tenover *et al.*, 1995). A MLST é baseada na análise de sequências do DNA, obtidas após a amplificação de (geralmente sete) genes *housekeeping* conservados na espécie, para a criação de um perfil de alelos ou *sequence type* (ST) (Maiden, 2006; Pérez-Losada *et al.*, 2013). Enquanto a PFGE tem sido utilizada em estudos epidemiológicos localizados, para a comparação de linhagens isoladas em programas de vigilância locais e em períodos de tempo mais curtos, a MLST é, geralmente, aplicada em estudos de epidemiologia amplos, permitindo comparar linhagens virulentas e resistentes aos antimicrobianos isoladas no mundo todo (Ranjbar *et al.*, 2014).

Em 2008, foi identificado um clone pandêmico de *E. coli*, identificado como ST131, que apresenta grande virulência e capacidade de causar infecções extraintestinais (Nicolas-Chanoine, Bertrand e Madec, 2014). Este clone é o mais bem estudado, e tem sido encontrado com grande frequência tanto em humanos quanto em animais domésticos e de produção, e vários estudos sugerem a transmissão deste patógeno via cadeia alimentar pelo consumo de carne de frango (Ewers *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2012; Mora *et al.*, 2010, 2013; Platell *et al.*, 2011). Além do clone ST131, *E. coli* pertencentes a outras ST têm sido descritas tanto em frangos quanto em humanos (Maluta *et al.*, 2014; Mora *et al.*, 2013).

No Brasil, pouco se conhece sobre a diversidade genética de *E. coli* isoladas de frangos e carnes. Apenas trabalhos mais recentes relatam o isolamento de *E. coli* ST10, ST48, ST93, ST95, ST117, ST155, ST363, ST453, ST1011, ST2197, ST2309 e ST2929 em frangos (Ferreira *et al.*, 2014a; b; Rojas *et al.*, 2014). Outro trabalho, no Brasil, relatou as novas ST4131-37 e ST4139-41, em APEC (Maluta *et al.*, 2014). Ainda, o referido estudo encontrou a ST2494 como a mais frequente em APEC, seguida por ST117, ST345, ST93 e ST616, e que ST10, ST88, ST93, ST117, ST131, ST155, ST359, ST648 e ST1011 eram compartilhadas entre linhagens de APEC e de ExPEC isoladas de humanos (Maluta *et al.*, 2014), mais uma vez, indicando a relação entre *E. coli* presente em aves de corte e as causadoras de infecção no homem.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A resistência aos antimicrobianos em bactérias patogênicas é, atualmente, um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, pois causa insucesso terapêutico, o que resulta no aumento dos períodos de internação hospitalar, das taxas de mortalidade e dos custos da assistência à saúde (Howard, Hopwood e Davies, 2014; Pitout, 2008; Sostarich *et al.*, 2008). Sendo assim, a disseminação de linhagens resistentes e de genes de resistência a diversas classes de antimicrobianos resulta na limitação das opções terapêuticas (WHO, 2011).

Neste contexto, nota-se o crescimento da importância das Enterobacteriaceae resistentes aos antimicrobianos em saúde pública, ao mesmo tempo em que sua presença em animais de produção e carnes, e a transmissão para o homem através da cadeia alimentar, têm sido discutida com crescente frequência (Botelho *et al.*, 2015; Carattoli, 2008; Donado-Godoy *et al.*, 2012; Dutil *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2016; Fricke *et al.*, 2009; Gyles, 2008; Koga *et al.*, 2015; Koningstein *et al.*, 2010; Layton e Galyov, 2007; Marshall e Levy, 2011; Martins *et al.*, 2011; Whichard *et al.*, 2010).

Sendo assim, a pesquisa sobre a resistência aos antimicrobianos na cadeia produtora de alimentos tem sido estimulada, visando gerar conhecimento sobre a diversidade de espécies bacterianas resistentes, os mecanismos de resistência apresentados por comensais e patógenos, e as formas de transferência de genes de resistência entre bactérias da microbiota no TGI de humanos e de animais (APUA, 2002).

A vigilância da resistência aos antimicrobianos em bactérias zoonóticas e comensais de diferentes animais de produção e de carnes derivadas destes animais é de extrema importância (Lammie e Hughes, 2016; WHO, 2011, 2012b). Esta necessidade é justificada por questões comerciais e de saúde pública, pois carnes apresentam características intrínsecas ideais para a multiplicação bacteriana, e são os principais alimentos responsáveis pela veiculação de patógenos ao homem (ICMSF, 2005).

Assim, como o Brasil é o maior exportador mundial de carnes de frango, e apresenta um consumo doméstico que está entre os maiores do mundo, e permanece em constante crescimento (USITC, 2012), o monitoramento da resistência em Enterobacteriaceae provenientes de frangos e carnes de frango revela-se essencial para o país. De fato, estudos realizados com carnes ou carcaças de frango no Brasil detectaram *E. coli* carreadoras de genes de resistência a antimicrobianos (Botelho *et al.*, 2015; Casella *et al.*, 2015; Koga *et al.*, 2015).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

- a) Conhecer e comparar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos apresentado por *E. coli* isoladas de amostras de carnes de frango comercializadas para o consumo humano em São José do Rio Preto – Brasil e em Lyon - França;
- b) Conhecer o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentado por *E. coli* isoladas do TGI de frangos de granjas localizadas na região de São José do Rio Preto;
- c) Estudar a relação clonal entre as linhagens isoladas no Brasil e entre as linhagens isoladas na França;
- d) Identificar genes de ESBL e pAmpC em todas as linhagens de *E. coli* isoladas de amostras de carnes de frango e do TGI de frangos que apresentam resistência às cefalosporinas de espectro estendido;
- e) Estudar o ambiente genético e os plasmídeos carreadores dos genes de ESBL e pAmpC detectados;
- f) Classificar as *E. coli* de acordo com os grupos filogenéticos.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento, identificação e manutenção de *Escherichia coli* a partir de carnes de frango do Brasil

Para avaliar a presença de *Escherichia coli* resistentes a ESC em carnes de frango destinadas ao consumo humano no Brasil, cinco amostras de carne resfriada foram adquiridas em cinco pontos distintos e aleatórios do varejo do município de São José do Rio Preto – SP, Brasil, durante o período de junho a setembro de 2014. As mesmas foram transportadas em caixas térmicas (temperatura entre 4-10 °C) para o Centro de Investigação de Microrganismos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CIM-FAMERP).

As amostras de coxas de frango foram esterilmente fracionadas em pedaços de 25 gramas, adicionadas em sacos Whirl-Pak® (Nasco) contendo 225 mL de Água Peptonada (Oxoid) (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011) acrescida de cefotaxima (4 µg/mL) ou ceftazidima (16 µg/mL), homogeneizadas e incubadas a 37 °C por 18-20 horas, de acordo com os métodos recomendados pelo “Bacteriological Analytical Methods”, do FDA (EUA, 2007). As concentrações dos antimicrobianos foram determinadas de acordo com os *breakpoints* para resistência descritos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014).

Após o período de incubação, o caldo de cultura foi semeado diretamente, e em diluições 10^{-2} e 10^{-4} , em ágar MacConkey (Oxoid) com as mesmas concentrações de antimicrobianos anterior, e incubadas a 37 °C por 18-20 horas. De 5 a 10 colônias com morfologia típica de *E. coli* – geralmente, lactose positivas (rosas) e secas, com precipitação de sais biliares ao redor da colônia (halo róseo ao redor da colônia) de 2-3 mm de diâmetro (PHE, 2015; Zimbro *et al.*, 2009) – foram purificadas em nova placa contendo ágar MacConkey com a mesma concentração do antimicrobiano da qual foram originárias e, após incubação a 37 °C por 18-20 horas, inoculadas em ágar CPS (bioMérieux) para identificar as linhagens pertencentes à espécie. De acordo com o fabricante, colônias de coloração róseo-amarronzadas são indicativas de *Escherichia coli*, e a sensibilidade e especificidade deste meio foram recentemente comprovadas (Meddeb *et al.*, 2014; Payne & Roscoe, 2015). Ainda assim, todas as linhagens selecionados para o estudo foram identificados por métodos bioquímicos automatizados, com auxílio do equipamento VITEK® 2 Compact (bioMérieux).

Todas as linhagens foram mantidos em coleção de cultura a -80 °C no CIM-FAMERP. Para tal, uma colônia isolada obtida das placas de ágar MacConkey acrescido de cefotaxima (4 µg/mL) ou ceftazidima (16 µg/mL) foi cultivada em caldo BHI (“Brain Heart Infusion”, Oxoid)

a 37 °C por 16-18 horas. Após este tempo, 0,8 mL da cultura foi transferido para criotubos estéreis contendo 0,2 mL de glicerol 50% estéril, a fim de se obter uma concentração final de 10% de glicerol, ideal para a preservação de culturas microbianas por períodos prolongados (Madigan et al., 2014). Para cada linhagem, o armazenamento foi realizado em duplicata.

4.2 Isolamento, identificação e manutenção de *E. coli* a partir de carnes de frango da França

Para avaliação da presença de *E. coli* resistentes a ESC em carnes de frango destinadas ao consumo humano produzidas na França, 48 amostras de carne resfriada foram adquiridas de quatro diferentes produtores durante outubro de 2015 a janeiro de 2016, sempre observando a não repetição dos lotes de cada amostra, no município de Lyon, França. As mesmas foram transportadas diretamente à *Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes* (AVB) da *Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail* (ANSES).

Cada amostra de carne foi esterilmente fracionada em duas porções de 10 gramas e adicionadas em um frasco de vidro contendo 100 mL de caldo BHI (Oxoid) e em outro frasco com BHI acrescido de cefotaxima (2 µg/mL). Ambos os inóculos foram incubados a 37 °C por 18-20 horas. O procedimento foi padronizado após modificações do protocolo para isolamento de *E. coli* produtoras de ESBL, AmpC e carbapenemases a partir de carnes frescas (Hasman *et al.*, 2015) publicado pelo “DTU Food”, National Food Institute, integrante do European Union Reference Laboratory.

Após a incubação, o caldo BHI foi semeado em ágar ChromID[®] ESBL (bioMérieux) e incubado a 37 °C por 18-20 horas; o caldo BHI acrescido com cefotaxima foi semeado em duas placas de ágar MacConkey (Sigma-Aldrich), também acrescido com cefotaxima (2 µg/mL), sendo uma incubada a 37 °C e outra a 44 °C, ambas por 18-20 horas. O ágar ChromID[®] ESBL permite identificar as *E. coli* produtoras de ESBL pela observação de colônias róseo-amarronzadas. Dessa forma, apenas uma colônia de cada placa foi selecionada para a continuação do estudo. Já com o ágar MacConkey, pode-se apenas predizer quais sejam as colônias com morfologia típica de *E. coli* (como descrito em 4.1). Assim, a partir das placas de MacConkey, foram selecionadas as colônias de diferentes morfotipos (porém, sempre predizentes de *E. coli*) para a continuação do estudo. Todas as colônias selecionadas foram purificadas em novo ágar ChromID[®] ESBL ou MacConkey e, após incubação a 37 °C por 18-20 horas, inoculadas em ágar Sangue de carneiro (bioMérieux) para subsequente identificação

e criopreservação. Todas as linhagens do estudo foram identificadas com auxílio do equipamento VITEK[®] MS (bioMérieux), que utiliza o sistema de espectrometria de massas MALDI-ToF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time-of-Flight*).

Todas as linhagens foram mantidas em coleção de cultura a -80 °C na ANSES-Lyon. Para tal, colônias da linhagem semeada em ágar Sangue foram transferidas diretamente para criotubos estéreis contendo caldo BHI acrescido de 25% de glicerol. Para cada linhagem, o armazenamento foi realizado em triplicata.

4.3 *E. coli* a partir de carnes de coelho da França

Com o intuito de avaliar o impacto do uso de β -lactâmicos na produção animal referente à presença de genes de resistência a essa classe de antimicrobianos, foram realizadas análises também em carnes de coelho, concomitante às carnes de frango. Esse tipo de carne foi considerado por duas razões: *i*) o uso de β -lactâmicos é proibido na produção de coelhos para corte na França (ANSES-ANMV, 2015), e *ii*) essa classe de antimicrobianos apresenta severa toxicidade em coelhos (Browning e Tune, 1983; Lim *et al.*, 2008). Assim, é bastante provável que, de fato, os animais da cadeia produtora de carnes de coelho não tiveram contato direto com β -lactâmicos e, conseqüentemente, espera-se avaliar se há correlação do uso, ou não, de beta-lactâmicos na produção animal e o isolamento de *E. coli* resistentes a ESC a partir de carnes desses animais.

Para tanto, 14 amostras de carne resfriada de coelho foram adquiridas de dois diferentes produtores durante outubro de 2015 a janeiro de 2016, sempre observando a não repetição dos lotes de cada amostra, no município de Lyon, França. Os procedimentos de isolamento, identificação e criopreservação das *E. coli* recuperadas a partir dessas amostras foram os mesmos descritos na seção 4.2.

4.4 Isolamento, identificação e manutenção de *E. coli* a partir do TGI de frangos no Brasil

Para avaliar a presença de *E. coli* resistentes a ESC no TGI de frangos que, posteriormente, seriam destinados ao corte, aproximadamente 40 aves de cada três fazendas (Fazendas 1, 2 e 3) do Estado de São Paulo foram amostradas durante o período de agosto a novembro de 2014. Para tanto, foi introduzido um *swab* estéril na cloaca de cada animal – sendo, este animal, separado dos demais – e imediatamente deixado em salina 0,9% estéril até

o momento de inoculação em ágar MacConkey. Após a amostragem na fazenda, os *swabs* foram transportados ao CIM-FAMERP para a continuação do isolamento bacteriano.

Os *swabs* foram semeados diretamente em ágar MacConkey (Oxoid) acrescido de cefotaxima (4 µg/mL), e as placas deixadas a 37 °C por 18-20 horas. De 5 a 10 colônias com morfologia típica de *E. coli* (descrita em 4.1) foram purificadas em novo ágar MacConkey com a mesma concentração de cefotaxima. As linhagens foram identificadas e criopreservadas como descrito na seção 4.1.

4.5 Tipagem molecular das linhagens do Brasil

Após o isolamento das *E. coli*, tanto do TGI quanto de carnes de frango do Brasil, foi realizada tipagem molecular com a técnica de REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-based Polymerase Chain Reaction*). Foram utilizados DNA extraídos pelo método de fervura, que consiste em ressuspender de 2 a 5 colônias do microrganismo em 200 µL de água destilada e submeter à 100 °C por 10 minutos, centrifugar à máxima velocidade por 1 minuto e utilizar o sobrenadante.

Para a realização da REP-PCR, foram utilizados *primers* (**Apêndice A**) e protocolos previamente descritos (Vila, Marcos e Jimenez de Anta, 1996). Para tanto, foi utilizado o *kit* “*Taq* DNA Polymerase” (Fermentas), e as reações foram conduzidas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), sob a seguinte condição de ciclagem: desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 40 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 4 minutos, e extensão final a 72 °C por 16 minutos.

Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sob um campo elétrico de 6 V/cm por 120 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio a 0,8% e visualizado e fotografado sob luz ultravioleta com auxílio do equipamento LPix Ex (Loccus Biothechnology).

Os perfis gerados foram analisados utilizando-se o programa Bionumerics® 6.6 (Applied Maths), com Otimização de 0% e Tolerância de 1%. A similaridade genética entre as linhagens foi determinada pelo índice de similaridade de Dice, e o dendrograma, construído segundo o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Linhagens com similaridade do perfil de REP-PCR $\geq 90\%$ foram consideradas clonais.

4.6 Tipagem molecular das linhagens da França

As linhagens provenientes da mesma amostra de carne de frango da França foram comparadas quanto ao perfil de restrição do DNA genômico pela enzima *XbaI*. A técnica de PFGE dos produtos de restrição foi utilizada, também, em algumas linhagens brasileiras, mesmo após a REP-PCR, visando ampliar a capacidade discriminatória na determinação da similaridade genética entre as linhagens.

Após tratamento com a enzima *XbaI*, os DNA foram submetidos à PFGE, onde o DNA é submetido a 3 diferentes direções de campo elétrico, que se alternam para forçar a passagem dessas grandes moléculas pela malha do gel de agarose. Para tanto, empregou-se protocolo padronizado pela ANSES, e utilizou-se as agaroses “Clean Cut 2%” e “Certified Megabase” (BioRad), o marcador de peso molecular “Lambda Ladder Chef DNA size standard” (BioRad) e o equipamento para eletroforese CHEF MAPPER (BioRad).

Inicialmente, foi preparada uma suspensão bacteriana a 4,8 da escala McFarland em NaCl 0,9% estéril, de onde foram centrifugados 100 µL a 16.000 g. O *pellet* foi ressuscitado em 45 µL de tampão TEE (Tris-Cl 10 mM pH 9; EDTA 100 mM; EGTA 10 mM) e 45 µL de agarose “Clean Cut 2%” a 56 °C, e os plugues (blocos de agarose contendo a bactéria) foram confeccionados. Depois de solidificados, os plugues contendo as bactérias foram submetidos à lise com 1% de N-Laurilsarcosil (Sigma) e 1 mg/mL de Proteinase K (Roche Diagnostics) em tampão TEE a 56 °C por 18-20 horas. Após seriadas lavagens em tampão TE (Tris-Cl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM), o DNA genômico liberado foi submetido à digestão com 40 U de *XbaI* (Promega) a 37 °C por 18-20 horas, e a PFGE subsequente foi realizada sob os parâmetros: *initial switch time* = 10 segundos, *final switch time* = 60 segundos, campo elétrico = 6 V/cm, e tempo de migração = 24 horas.

O resultado da eletroforese foi visualizado após coloração do gel com 0,5 µg/mL de brometo de etídio, e fotografado com auxílio do equipamento “Gel DocTM XR+” e do *software* “Image LabTM” (BioRad). Os perfis de restrição foram analisados e comparados como descrito na seção 4.4. Linhagens com similaridade do perfil $\geq 90\%$ foram consideradas clonais, e somente uma foi selecionada, arbitrariamente, para os testes subsequentes, quando as linhagens foram provenientes da mesma amostra de carne.

4.6.1 Tipagem por *Multi-Locus Sequence Typing*

A técnica de MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*) foi utilizada apenas para caracterizar as linhagens bacterianas isoladas na França que apresentaram alguma informação epidemiologicamente relevante. A técnica de MLST foi realizada de acordo com o esquema de Achtman (Wirth *et al.*, 2006), com modificações de acordo com http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi_html. Cada linhagem a ser tipada foi submetida a sete diferentes PCR para amplificar os seguintes sete genes constitutivos: *adk* (gene da adenilato quinase), *fumC* (gene da fumarato hidratase), *gyrB* (gene da DNA girase), *icd* (gene da isocitrato/isopropilmalato desidrogenase), *mdh* (gene da malato desidrogenase), *purA* (gene da adenilosuccinato desidrogenase) e *recA* (sítio de ligação de ATP/GTP).

Essas PCR foram conduzidas em termociclador T100[®] Thermal Cycler (BioRad), sob a seguinte condição de ciclagem: desnaturação inicial a 94 °C por 15 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 54/58/60/68 °C (dependendo do gene – ver **Apêndice A**) por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, finalizando com 5 minutos de extensão a 72 °C. Os produtos foram analisados como descrito na seção 4.8, e os produtos das reações foram enviados à Beckman Coulter Genomics para o sequenciamento com os mesmos *primers* utilizados nas PCR. As sequências resultantes foram analisadas no *site* <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>, onde são identificados os alelos de cada gene e, então, é gerado o ST de cada linhagem de *E. coli* de acordo com o perfil de alelos.

4.7 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e teste fenotípico de β -lactamases

As linhagens isoladas no Brasil e na França submetidas à tipagem molecular foram triadas e submetidas ao Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA) pelo método de disco-difusão em ágar Müeller-Hinton (BioRad), interpretado de acordo com as recomendações do Comitê de Antibiogramas da Sociedade Francesa de Microbiologia, associada ao EUCAST (CASFM, 2015; CASFM-VET, 2015). A cepa *Escherichia coli* CIP 76.24 (ATCC 25922), da Coleção de Cepas do Instituto Pasteur, foi utilizada como controle de qualidade neste ensaio por apresentar susceptibilidade conhecida a determinados antimicrobianos.

Neste teste, realizado de acordo com padronização pela ANSES, foram avaliados os seguintes antimicrobianos de interesse clínico e veterinário: amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalotina, cefuroxima, cefotaxima, ceftiofur, piperacilina, ticarcilina, piperacilina/tazobactan, ticarcilina/ácido clavulânico, ertapenem, ceftazidima, cefoxitina,

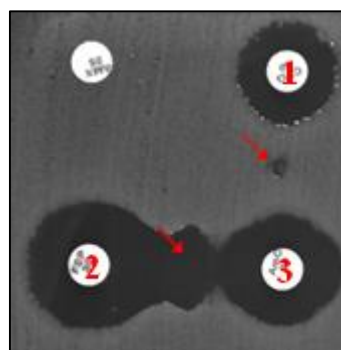
cefepima, aztreonam, cefquinoma, estreptomicina, canamicina, amicacina, apramicina, gentamicina, tobramicina, netilmicina, cloranfenicol, florfenicol, tetraciclina, colistina, sulfonamidas, trimetoprim, ácido nalidíxico, enrofloxacina e ofloxacina.

Para tanto, a partir de colônias de crescimento recente (aproximadamente 20 horas) em ágar Sangue, foi realizada uma suspensão bacteriana de 0,5 na escala de McFarland em solução de NaCl 0,9% estéril, com auxílio do equipamento Densimat® (bioMérieux) para certificar a escala. A suspensão foi diluída na proporção 1:10 para inoculação no ágar Müller-Hinton. Então, os discos dos 32 antimicrobianos mencionados acima foram posicionados equidistantes, em duas placas, sendo depositados 16 discos em cada placa. As bactérias foram incubadas a 37 °C por 18-20 horas, e os resultados foram visualizados com auxílio do equipamento SirSCAN Micro® (i2a Diagnostics).

A disposição dos discos de antimicrobianos em uma das placas permitiu a realização, concomitante, do “teste fenotípico da produção de ESBL por aproximação de discos”. Esse teste consiste em dispor discos de β -lactâmicos ao redor de um disco de β -lactâmico/inibidor de β -lactamase, distantes 30 mm de centro a centro (Drieux *et al.*, 2008). Após a incubação, o resultado positivo é indicado pela formação de uma “zona fantasma”, ou deformação do halo de inibição próximo ao disco de β -lactâmico/inibidor de β -lactamase (**Figura 4**).

Este teste baseia-se na inibição da β -lactamase, produzida pela bactéria testada, pelo inibidor de β -lactamases utilizado, fazendo com que a bactéria não suporte a concentração do β -lactâmico em determinada região do ágar, onde, então, não há crescimento bacteriano, e ocorre a deformação do halo ou aparecimento da “zona fantasma”.

Figura 4 – Exemplo de resultado do teste fenotípico de produção de ESBL. As setas vermelhas apontam as “zonas fantasmas”, onde houve inibição da β -lactamase da bactéria testada pelos inibidores de β -lactamase, impedindo o crescimento bacteriano. 1: cefquinoma (β -lactâmico); 2: cefepima (β -lactâmico); 3: amoxicilina/ácido clavulânico (β -lactâmico/inibidor de β -lactamase).



4.8 Extração de DNA genômico

Para a obtenção do DNA genômico, foi utilizado o *kit* NucleoSpin® Genomic DNA from Tissue (Macherey-Nagel). Para tanto, as linhagens foram reativadas, da criopreservação, diretamente em ágar Sangue e incubadas por 18-20 horas a 37°C. Após, 2-5 colônias foram diluídas em 500 µL de água estéril e centrifugadas a 11.000 g por 2 minutos. A partir desta etapa, seguiram-se as diretrizes e os reagentes do fabricante, submetendo as linhagens bacterianas às etapas de lise celular por ação da enzima Proteinase K, e o material genético liberado foi purificado com auxílio de colunas de sílica e tampões que acompanham o *kit*.

O DNA obtido foi armazenado a 4-10 °C, quando manipulado com frequência, ou a -20 °C, para armazenamento prolongado.

4.9 Detecção e identificação dos genes de resistência às ESC

Para a detecção dos genes responsáveis pela resistência às ESC nas linhagens bacterianas do estudo, foi utilizada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*), e o “QIAGEN® Multiplex PCR Kit 1000” (Qiagen), que utiliza enzima Hot-Star *Taq* DNA polimerase.

Desde 2004, existe uma classificação para CTX-M, quando havia apenas 40 variantes diferentes (Bonnet, 2004). Assim, no presente trabalho, foi adotada a classificação de D’Andrea e colaboradores (D’Andrea *et al.*, 2013), que segue a classificação de grupos de CTX-M de Bonnet. Primeiramente, foi avaliada a presença de genes *bla*_{CTX-M}, utilizando-se *primers* e protocolos previamente descritos na literatura (Dallenne *et al.*, 2010), apresentados no **Apêndice A**. Com esta metodologia, é possível detectar *bla*_{CTX-M}-grupo 1, *bla*_{CTX-M}-grupo 2 e *bla*_{CTX-M}-grupo 9 em uma triplex-PCR, e *bla*_{CTX-M}-grupo 8 e *bla*_{CTX-M}-grupo 25 em uma PCR convencional. Essas PCR foram conduzidas em termociclador T100® Thermal Cycler (BioRad), sob a seguinte condição de ciclagem: desnaturação inicial a 94 °C por 15 minutos (esse tempo é necessário para ativação da enzima *Taq* Polimerase do *kit* utilizado), seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 40 segundos, anelamento dos *primers* a 60 °C por 40 segundos e extensão do produto a 72 °C por 1 minuto, finalizando com 7 minutos de extensão a 72 °C. Os produtos foram analisados com auxílio do equipamento QIAxcel Advanced (Qiagen), utilizando o marcador de peso molecular “QX Size Marker 100 pb – 2.5 kb” (Qiagen).

Quando nenhum gene da família *bla*_{CTX-M} foi detectado, foi avaliada a presença de genes das famílias *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, de acordo com *primers* (**Apêndice A**) e protocolos previamente

descritos (Gaillot *et al.*, 1998; Taneja *et al.*, 2012). A condição de ciclagem dessas PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C (para *bla*_{TEM}) ou 60 °C (para *bla*_{SHV}) por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, com extensão final a 72 °C por 7 minutos. As reações também foram conduzidas em termociclador T100[®] Thermal Cycler, e os produtos foram analisados como descrito acima.

Linhagens que apresentaram resistência ao antimicrobiano cefoxitina, uma cefamicina, foram submetidas à PCR para detecção do gene *bla*_{CMY-2/-4}, que também pode ser responsável pela resistência à ESC. Essas PCR foram realizadas utilizando-se *primers* (**Apêndice A**) e protocolos previamente descritos (Mammeri *et al.*, 2010), e também foram conduzidas em termociclador T100[®] Thermal Cycler, sob a seguinte condição de ciclagem: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, finalizando com 7 minutos de extensão a 72 °C. Os produtos foram analisados como descrito acima.

Como controles positivos para todas as reações, foram utilizados DNA de cepas previamente caracterizadas e sequenciadas da coleção de cultura bacteriana do AVB-ANSES, Lyon.

4.9.1 Identificação e contexto genético dos genes *bla*_{CTX-M-grupo 1}

Após confirmação por PCR da presença dos genes *bla*_{CTX-M}, as linhagens positivas para *bla*_{CTX-M-grupo 1} foram submetidas a uma nova PCR com os *primers* (**Apêndice A**) ISEcp1 (5'-AAAATGATTGAAAGGTGGT-3') e P2D (5'-CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG-3') para amplificar todo o gene e a porção final da sequência de inserção ISEcp1, em um fragmento de aproximadamente 1.100 pb (Carattoli *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2010). Positividade para essa reação comprova a presença de ISEcp1 imediatamente *upstream* ao gene *bla*_{CTX-M-grupo 1}.

As PCR foram conduzidas em termociclador T100[®] Thermal Cycler, sob a seguinte condição de ciclagem: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 10 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, com 3 minutos de extensão final a 72 °C. Os produtos foram analisados como descrito anteriormente, na seção 4.8, e foram, então, enviados à Beckman Coulter Genomics (Inglaterra) para o sequenciamento de acordo com os procedimentos padrões da empresa.

Os resultados foram analisados com auxílio dos programas *online* “Translate Nucleic Acid Sequence Tool” – para a tradução das sequências – e “Clustal Omega” – para a

comparação das sequências –, disponíveis nos *website* <http://biotools.umassmed.edu/cgi-bin/biobin/transeq> e <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, respectivamente. As sequências originadas foram comparadas a outras previamente depositadas na base de dados GenBank.

4.9.2 Identificação de genes *bla*_{CTX-M}-grupo 8 ou -grupo 25

Quando foi identificada a presença de genes *bla*_{CTX-M}-grupo 8 ou -grupo 25 (Dallenne *et al.*, 2010), foram realizadas PCR adicionais específicas para *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{CTX-M-25}, utilizando *primers* (**Apêndice A**) e protocolos previamente descritos (Chmelnitsky *et al.*, 2005; Shibata *et al.*, 2006). As PCR foram conduzidas em termociclador T100[®] Thermal Cycler (BioRad). Para *bla*_{CTX-M}-grupo 8, a condição de ciclagem foi: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, finalizando com 7 minutos de extensão a 72 °C. Para *bla*_{CTX-M}-grupo 25, a condição de ciclagem foi: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, finalizando com 7 minutos de extensão a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados como descrito na seção 4.9, e os positivos foram enviados à Beckman Coulter Genomics para o sequenciamento com os mesmos *primers* utilizados na PCR. Os resultados foram analisados como descrito em 4.9.1.

4.9.3 Identificação dos demais genes de resistência detectados

Após positividade na PCR para detecção dos genes *bla*_{CTX-M}-grupo 2, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CMY-2/-4}, os produtos foram enviados à Beckman Coulter Genomics para o sequenciamento com os mesmos *primers* utilizados nas PCR. Os resultados foram analisados como descrito em 4.9.1, à exceção dos genes *bla*_{CTX-M}-grupo 2, que foram amplificados e sequenciados com *primers* (**Apêndice A**) e protocolo descritos por Bertrand e colaboradores (Bertrand *et al.*, 2006).

4.9.4 Ambiente genético de genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CMY-2}

O estudo do ambiente genético dos genes *bla*_{CTX-M}-grupo 1 está descrito na seção 4.9.1.

As linhagens de *E. coli* carreadoras de *bla*_{CTX-M-2} foram submetidas a diversas PCR para determinar a presença ou ausência da *ISCR1 upstream* ao gene e a arquitetura do integron de

classe 1 no qual poderiam estar inseridos. Para tanto, foram utilizados *primers* (**Apêndice A**) e protocolos previamente descritos (Power *et al.*, 2005). As PCR foram conduzidas em termociclador T100[®] Thermal Cycler (BioRad), sob as condições de ciclagem: desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos, finalizando com 7 minutos de extensão a 72 °C. Os produtos das PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, sob um campo elétrico de 6 V/cm por 60 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio a 0,8% e visualizado e fotografado sob luz ultravioleta com auxílio do equipamento LPix Ex (Loccus Biothecnology). Quando houve positividade para inserção em integron de classe 1, a região variável de cassetes gênicos foi enviada ao IBTEC (Instituto de Biotecnologia da UNESP), em Botucatu-SP, para o sequenciamento com os mesmos *primers* utilizados nas PCR. O referido laboratório utiliza o equipamento ABI 3500 (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados foram analisados como descrito em 4.9.1.

Quando *bla*_{CTX-M-8} foi identificado, uma nova PCR foi realizada para determinar a presença ou ausência da *IS10 upstream* ao gene. Para tanto, foram desenhados os *primers* IS10down (5'-TCGCTTTGGTTGGCAGGTTACG-3') e CTXM8up (5'-ACTGGTGCTGCA CATGGCAAAG-3') (**Apêndice A**) com auxílio do programa Accelrys Gene[®], especificamente para esse estudo. As PCR foram conduzidas em termociclador T100[®] Thermal Cycler (BioRad), sob as condições de ciclagem: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 63 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, finalizando com 7 minutos de extensão a 72 °C. Os produtos das PCR foram analisados em gel de agarose, como descrito acima. O produto amplificado foi enviado ao IBTEC para o sequenciamento com o *primer* IS10down. O resultado foi analisado como descrito em 4.9.1.

Nas linhagens carreadoras de *bla*_{CMY-2}, foi realizada PCR adicional com os *primers* ISEcp1U1 (5'-AAAAATGATTGAAAGGTGGT-3') e CITMR (5'-TTTCTCCTGAACGTGG CTGGC-3') (**Apêndice A**), previamente descritos (Pérez-Pérez e Hanson, 2002; Saladin *et al.*, 2002). A reação foi conduzida em termociclador T100[®] Thermal Cycler (BioRad), sob as condições de ciclagem: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, finalizando com 7 minutos de extensão a 72 °C. Os produtos foram analisados em gel de agarose, como descrito acima.

4.10 Ensaio de conjugação bacteriana em meio líquido

Com a finalidade de avaliar se os plasmídeos portadores dos genes de resistência eram passíveis de serem transferidos para outras bactérias, foi realizado o teste de conjugação em meio líquido, utilizando-se a cepa de *Escherichia coli* K-12 J53, resistente à rifampicina e sensível aos β -lactâmicos, como cepa receptora, empregando-se protocolo padronizado pela ANSES.

Para tanto, as linhagens a serem testadas, mais a cepa receptora, foram reativadas, diretamente do criotubo, em 5 mL de caldo BHI e deixadas em banho-maria sob agitação a 37 °C por 5-6 horas. Então, 50 μ L do caldo com bactéria foi inoculado em 10 mL de caldo BHI e incubado em banho-maria sob agitação a 37 °C por 18-20 horas. No dia seguinte, 100 μ L deste caldo com bactéria foi inoculado em um novo tubo com 10 mL de caldo BHI, e deixado em banho-maria sob agitação a 37 °C por 5-6 horas. A seguir, em um tubo estéril, foram adicionados 4 mL do caldo crescido com a cepa receptora e 1 mL do caldo crescido com a linhagem a ser testada, e o tubo foi deixado por 18-20 horas, sem agitação, a 37 °C. Somente no teste com as linhagens portadoras de *bla*_{CTX-M-2} a temperatura teste foi de 30 °C, uma vez que considera-se a origem desses genes como sendo ambiental e, dessa forma, as primeiras conjugações naturais devem ter ocorrido em temperatura próxima à temperatura ambiente.

No dia seguinte, 100 μ L da mistura (cepa receptora + linhagem doadora de plasmídeo) foram inoculados, diretamente e na diluição 10^{-1} , em ágar Müeller-Hinton adicionado de rifampicina (250 μ g/mL) e cefotaxima (5 μ g/mL). As placas com ágar foram deixadas a 37 °C por 18-20 horas. No dia seguinte, colônias típicas de *Escherichia coli* K-12 J53 – as possíveis transconjugantes (cepa receptora que recebeu o plasmídeo da bactéria selvagem portadora) – foram inoculadas em ágar Müeller-Hinton adicionado de cefotaxima (5 μ g/mL). Para confirmar a transferência do plasmídeo, as possíveis transconjugantes foram semeadas em ágar Sangue (BioMérieux) e, após 18-20 horas, foi realizado o TSA e a PCR para confirmação do gene de resistência da linhagem doadora, conforme descrito nas seções 4.7 e 4.9, respectivamente.

4.11 Plasmídeos carreadores de genes *bla*

4.11.1 Caracterização dos plasmídeos quanto ao grupo de incompatibilidade

Após identificação dos clones, as linhagens de trabalho foram submetidas ao esquema de tipagem de plasmídeos por PCR baseado em *replicons* (PBRT – do inglês *PCR-based replicon typing scheme*) (Carattoli *et al.*, 2005).

Para tanto, o DNA total extraído de cada linhagem foi submetido a oito diferentes multiplex-PCR, utilizando-se o “PBRT kit[®] – PCR-based replicon typing” (Diatheva). Com esse *kit* comercial, é possível amplificar os seguintes 25 replicons: HI1, HI2, I1, I2, X1, X2, L/M, N, FIA, FIB, FIC, FII, FII_S, FII_K, W, Y, P, A/C, T, K, U, R, B/O, HIB-M e FIB-M. Estes representam a maioria dos grupos de incompatibilidade do *replicon* básico de plasmídeos de resistência identificados entre as espécies da família Enterobacteriaceae (Carattoli, 2011; Carattoli *et al.*, 2005; Villa *et al.*, 2010).

Para essas PCR, foi utilizado o “QIAGEN[®] Multiplex PCR Kit1000” (Qiagen), e as reações foram conduzidas em termociclador T100[®] Thermal Cycler (BioRad), sob a seguinte condição de ciclagem: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, finalizando com 5 minutos de extensão a 72 °C. Os produtos foram analisados como descrito na seção 4.9.

4.11.2 Caracterização dos plasmídeos quanto ao tamanho

Tanto linhagens selvagens quanto cepas transconjugantes de genes de resistência foram submetidas à linearização dos plasmídeos pela ação da nuclease S1 e, em seguida, submetidas à PFGE.

Para tanto, utilizou-se o mesmo protocolo padronizado pela ANSES, reagentes e equipamentos descritos anteriormente (seção 4.6), com a diferença que, para a confecção destes blocos de agarose, foi utilizada uma maior quantidade da suspensão bacteriana em NaCl 0,9% (1 mL da solução 4,8 da escala McFarland ao invés de 100 µL). Os DNA foram submetidos à digestão com 100 U da enzima S1 (Promega) a 37 °C por 30 minutos, e a PFGE foi realizada sob os parâmetros: *initial switch time* = 1 segundo, *final switch time* = 30 segundos, campo elétrico = 6 V/cm, e tempo de migração = 20 horas.

O resultado da eletroforese foi visualizado como descrito na seção 4.6, e foram considerados apenas os plasmídeos maiores que 50 kb de tamanho molecular, pois o marcador de peso molecular (Lambda Ladder Chef DNA Size Standard – BioRad) utilizado permite apenas a comparação a partir deste. Dessa forma, comparando-se as bandas dos plasmídeos com as bandas do marcador molecular padrão foi possível medir o tamanho dos plasmídeos portados pelas linhagens selvagens ou pelas transconjugantes.

4.12 Estudo de genes *bla* inseridos no cromossomo

Quando não foi obtido sucesso no ensaio de conjugação do plasmídeo carreador de gene de resistência, e não foi confirmada a localização plasmidial do gene com as técnicas empregadas acima, foram realizadas metodologias específicas para a detecção do gene no cromossomo bacteriano. As linhagens investigadas por esta metodologia foram submetidas à ação da enzima I-*CeuI* e, em seguida, submetidas à PFGE.

Primeiramente, os plugues de agarose foram confeccionados seguindo-se o mesmo protocolo para a tipagem molecular (seção 4.6) e, em seguida, utilizou-se 5 U da enzima I-*CeuI* (New England Biolabs) por 18-20 horas a 37 °C. Então, a PFGE foi realizada sob um campo elétrico de 6 V/cm em dois blocos subsequentes, sendo os parâmetros do primeiro bloco (12 horas): *initial switch time* = 20 segundos e *final switch time* = 120 segundos, e os do segundo bloco (12 horas): *initial switch time* = 60 segundos e *final switch time* = 100 segundos.

O resultado da eletroforese foi visualizado como descrito na seção 4.6, e utilizado na posterior comparação da posição do gene de resistência com a posição dos genes *rrn*, da subunidade 23S do rRNA, para confirmar ou não a localização cromossômica do primeiro. Assim, para cada linhagem analisada foram necessárias 2 PFGE, pois um resultado foi utilizado para hibridar com uma sonda para o gene de resistência e o outro, com a sonda para genes *rrn*, esta última utilizando os *primers* wl-3110 e wl-3111 (Han *et al.*, 2007). Imediatamente após a PFGE, seguiu-se a técnica *Southern blot*.

4.13 Técnica *Southern blot*

A técnica *Southern blot* foi utilizada para transferir os fragmentos de DNA contidos nos géis de agarose após a PFGE-S1 ou PFGE-I-*CeuI* para uma membrana de nylon de acordo com protocolo padronizado pela ANSES. Para a transferência de DNA do gel de PFGE para a membrana de nylon, foi utilizado o equipamento Pierce Power Blot Station[®] (Thermo Fisher

Scientific), que realiza o *Southern blot* pelo uso de corrente elétrica ao longo de, aproximadamente, 60 minutos.

Uma membrana de nylon Amersham HybondTM-N⁺ (GE Healthcare) foi depositada em cima do gel de PFGE, e ambos foram depositados entre duas folhas de papel absorvente (Whatman) embebidos em tampão TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) entre os eletrodos do aparelho. Ao término do procedimento, a membrana de nylon foi lavada em solução SSC 2X e deixada para secar por 18-20 horas em temperatura ambiente.

4.14 Hibridação do DNA da membrana de nylon com sonda

Após a impregnação da membrana de nylon com os fragmentos de DNA, fez-se a hibridação dos mesmos com sondas específicas para as regiões de interesse, a fim de se determinar a localização destes fragmentos. Após o resultado, foram comparados os tamanhos das bandas presentes no gel de agarose e as bandas reveladas na membrana de nylon. Assim, as técnicas *Southern blot* seguida de hibridação foram utilizadas para a determinação do ambiente genético, tanto para identificar ou confirmar o tamanho e o grupo de incompatibilidade dos plasmídeos quanto para confirmar a localização cromossômica, dos genes de resistência das linhagens do estudo. Para tanto, seguiu-se protocolo padronizado pelo fabricante dos reagentes de hibridação.

Anteriormente ao início da hibridação, foi realizada uma PCR para a preparação da sonda. Utilizou-se o “PCR DIG Probe Synthesis Kit” (Roche Diagnostics): 5 µL de tampão 10X, 5 µL de “PCR dig probe”, 2,5 µL dos mesmos *primers* (20 µM) utilizados na PCR para detecção do fragmento a ser identificado, 0,75 µL do *mix* da enzima, 32,75 µL de água e 4 µL de DNA de uma amostra sabidamente positiva para o fragmento de DNA em questão. Os parâmetros da PCR foram os mesmos utilizados quando na detecção do fragmento (específica para cada gene investigado).

A membrana de nylon já impregnada com os DNA foi, então, submetida a seriadíssimos tratamentos com tampões com auxílio do *kit* “DIG Wash and Block Buffer Set” (Roche Diagnostics). Primeiramente, a membrana foi submetida à uma lavagem pré-hibridação (SSC 5X, 0,1% de N-Laurilsarcosil, 0,02% de SDS, 1% de “Blocking Reagent” – este último acompanha o *kit*) por 4 horas a 42 °C. Após, a sonda – pré-preparada – foi desnaturada a 100 °C por 4 minutos e misturada a uma nova solução de pré-hibridação, onde a membrana foi deixada por 18-20 horas a 42 °C. No dia seguinte, a membrana foi lavada na solução SSC 2X, 0,1% de SDS à temperatura ambiente, e na solução SSC 0,5X, 0,1% de SDS a 68 °C. Após, a

membrana foi lavada com ácido maleico 1X e, então, submetida à Solução de Bloqueio (ácido maleico 1X e 1% de “Blocking Reagent”) por 45 minutos à temperatura ambiente. Então, foi adicionado o anticorpo “Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments” (Roche Diagnostics) a uma nova Solução de Bloqueio, onde a membrana foi deixada por 30 minutos à temperatura ambiente. A membrana foi lavada várias vezes com Tampão de Lavagem 1X (acompanha o *kit* “DIG Wash and Block Buffer Set”) e equilibrada em Tampão de Detecção 1X (também acompanha o *kit*). O substrato corante de biotina “NBT/BCIP stock solution” (Roche Diagnostics) foi diluído em um novo Tampão de Detecção 1X, onde a membrana foi deixada sob o abrigo da luz até a reação ser parada com a adição de água, no máximo no dia subsequente. Regiões coradas em roxo indicam a hibridação da sonda ao alvo no DNA.

4.15 Classificação das linhagens de *E. coli* em grupos filogenéticos

Para a classificação das linhagens de *E. coli* em grupos filogenéticos, foram utilizados o “QIAGEN® Multiplex PCR Kit 1000” (Qiagen) e *primers* (**Apêndice A**) e protocolos previamente descritos. A leitura dos resultados de grupo filogenético foi realizada conforme o esquema de Escobar-Páramo e colaboradores para uma comparação mais precisa entre as linhagens isoladas (Escobar-Páramo *et al.*, 2006), porém baseado no esquema classificatório inicial de Clermont (Clermont, Bonacorsi e Bingen, 2000), e utilizando os *primers* descritos por Doumith e colaboradores (Doumith *et al.*, 2012).

As PCR foram conduzidas em termociclador T100® Thermal Cycler (BioRad), sob a seguinte condição de ciclagem: desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 65 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, finalizando com 7 minutos de extensão a 72 °C. Os produtos foram analisados com auxílio do equipamento QIAxcel, como descrito na seção 4.9.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Linhagens de *Escherichia coli* isoladas de carnes e do TGI de frangos no Brasil

Foi obtido um total de 49 linhagens de *E. coli* resistente a ESC a partir de todas as cinco amostras de carne de frango originadas do Brasil.

Cento e dezenove linhagens de *E. coli* resistentes a ESC foram isoladas de 63 aves (58,3% do total de 117 frangos) analisadas nas três fazendas.

5.2 Linhagens de *Escherichia coli* isoladas a partir de carnes de frango e de carnes de coelho na França

Dentre as 48 amostras de carne de frango avaliadas, 44 (91,7%) continham, ao menos, uma linhagem de *E. coli* resistente a ESC. Foram obtidas 107 linhagens a partir das amostras de carne de frango analisadas.

Dentre as 14 amostras de carne de coelho avaliadas, duas (14,3%) continham uma linhagem de *E. coli* resistente a ESC cada uma.

5.3 Tipagem molecular das linhagens de *E. coli*

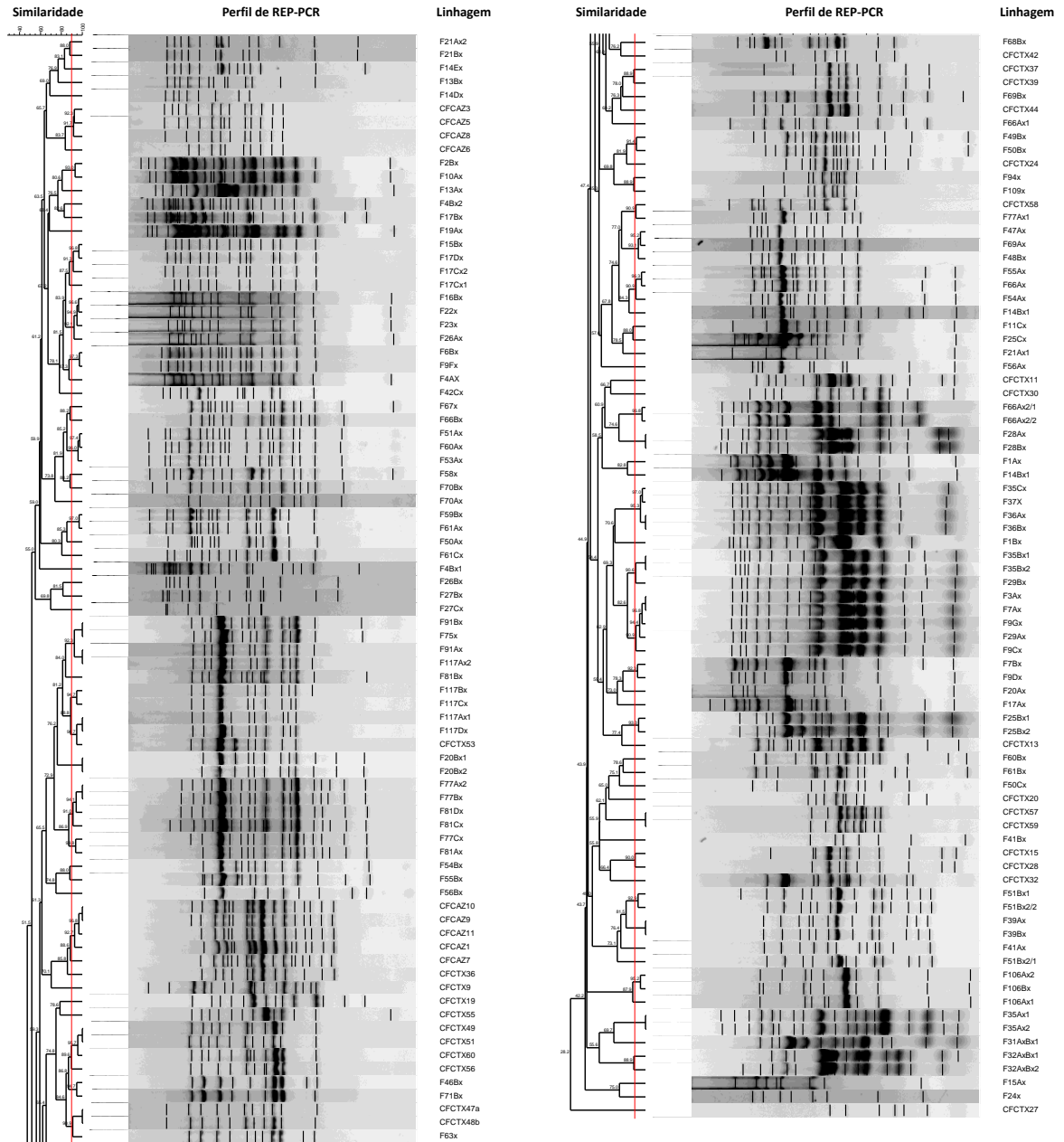
5.3.1 Tipagem molecular das linhagens isoladas de carnes e do TGI de frangos no Brasil

A tipagem molecular por REP-PCR (**Figura 5**) evidencia que há similaridade entre linhagens isoladas de aves diferentes, porém de uma mesma fazenda, bem como há similaridade entre linhagens isoladas de mesma amostra de carne. Contudo, não houve similaridade entre linhagens isoladas de amostras de carne diferentes ou de frangos de diferentes fazendas.

Três exceções foram observadas. A linhagem CFCTX53, isolada de CRF5, apresentou similaridade maior que 90% com linhagens de *E. coli* isoladas do frango 117, proveniente da Fazenda 3. O mesmo ocorreu entre as linhagens CFCTX47, CFCTX48 e F63x, e entre as linhagens CFCTX58 e F77Ax1 (**Figura 5**).

Arbitrariamente, foram selecionadas 60 linhagens (35,7% do total de 168) para os experimentos posteriores, sendo 18 provenientes de carnes (36,7% das 49 linhagens de CRF) e 42 de TGI de frangos (35,3% das 119 linhagens de cloacas).

Figura 5 – Dendrograma gerado pelo *software* BioNumerics 6.6 para comparação dos perfis eletroforéticos de REP-PCR das linhagens isoladas de carnes e do TGI de frangos do Brasil. A linha vermelha indica similaridade mínima de 90% entre os perfis. (O dendrograma aparece em duas partes separadas por razões de espaço na página deste trabalho.)



5.3.2 Tipagem molecular por restrição do DNA genômico e MLST das linhagens isoladas de carnes de frango e de carnes de coelho na França

A **Figura 6** apresenta o dendrograma gerado pelo perfil de restrição genômica de linhagens de carnes de frango e de carnes de coelho. Observa-se que colônias previamente selecionadas apresentando morfotipos diferentes nos ágaros foram consideradas clonais em alguns casos, como para algumas linhagens provenientes de carnes de frango.

Cinco linhagens isoladas de diferentes amostras de carnes de frango foram alocadas em um mesmo *cluster*, sendo consideradas “clonais”, como pode ser melhor observado na **Figura 7**. As linhagens P36B1 e P36B2, presentes neste *cluster*, foram provenientes de uma mesma amostra de carne; assim, foi selecionada apenas P36B1 para a realização dos experimentos seguintes. As demais linhagens do *cluster* (P6A1, P21B4, P44B1 e P45B2), juntamente com P36B1, foram todas isoladas de amostras de carnes diferentes, mesmo em dias diferentes, e de produtores (B e C) diferentes. Ainda, a linhagem P34B1 apresentou similaridade muito próxima (89,4%) à das linhagens que formaram o *cluster*, com apenas uma banda claramente diferente das demais (**Figura 7**), porém não foi considerada como pertencente ao *cluster* por estar abaixo do limite de similaridade de 90%. Dentre as linhagens pertencentes ao *cluster* formado, P44B1 foi selecionada, ao acaso, e a tipagem por MLST identificou o clone ST1640.

As duas linhagens de *E. coli* resistentes a ESC provenientes de carnes de coelho apresentaram perfil de restrição genômica por *XbaI* completamente distintos entre si, e distintos das linhagens provenientes de carnes de frango (**Figura 6**). Ambas foram tipadas por MLST, e foram identificadas como os clones ST1158 (linhagem L5A1) e ST162 (linhagem L7B1).

Após tipagem molecular das linhagens da França, 77 linhagens de carnes de frango e as 2 de carnes de coelho foram submetidas aos experimentos subsequentes.

Figura 6 – Dendrograma das linhagens de carnes de frango e de coelho da França gerado a partir dos perfis de restrição genômica por *XbaI* seguida de PFGE. A primeira coluna compõe os nomes das linhagens; a segunda coluna (“Pr”), a identificação dos produtores das amostras de carnes; e a terceira coluna, a data de processamento, no AVB-ANSES, das amostras de carne. A linha vermelha indica uma similaridade de 90% entre os perfis. Os retângulos azuis nos nomes das linhagens indicam as consideradas “clonais” provenientes da mesma amostra de carne. O retângulo vermelho indica um *cluster* formado por linhagens provenientes de amostras de carnes diferentes.

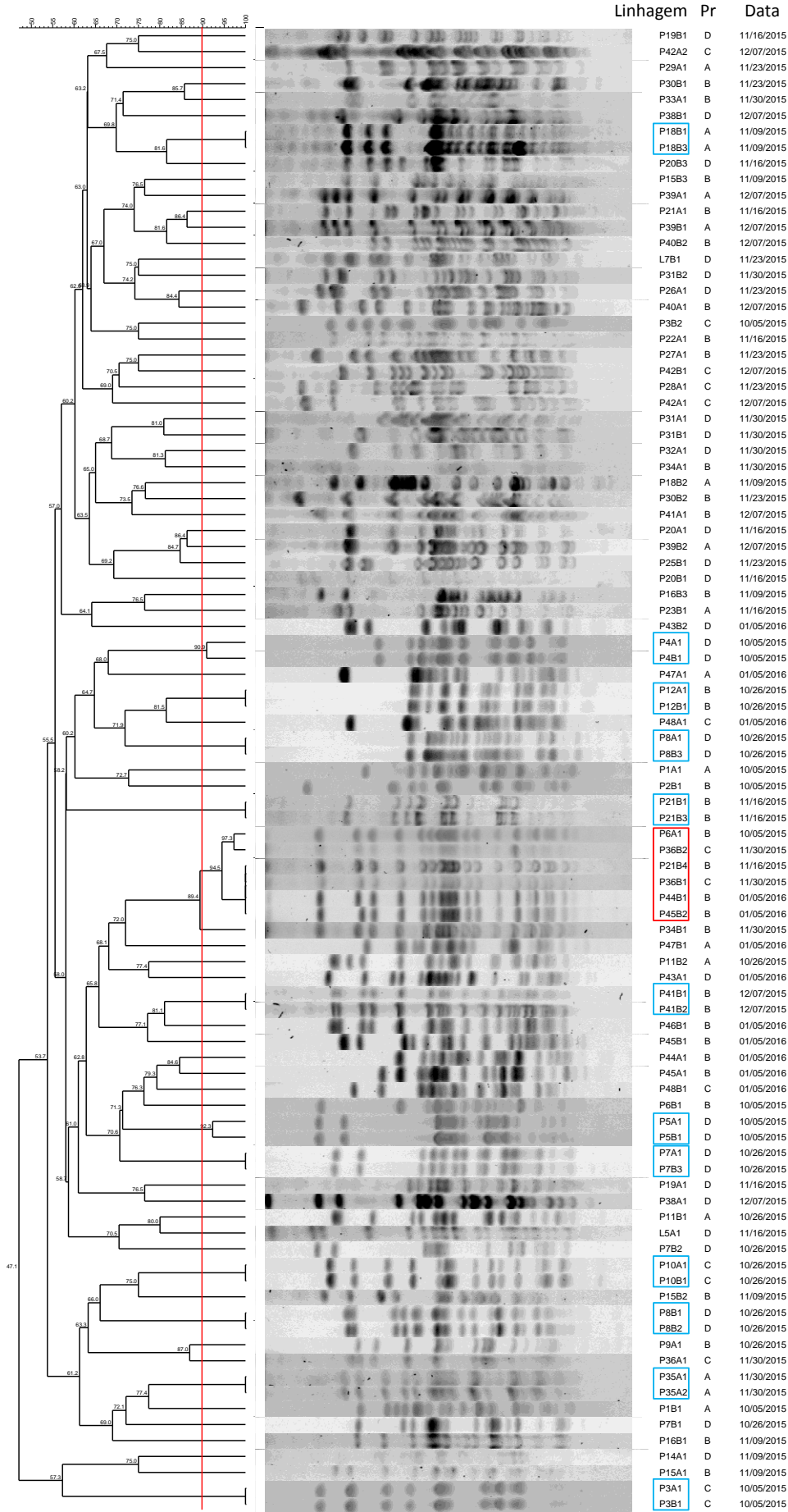
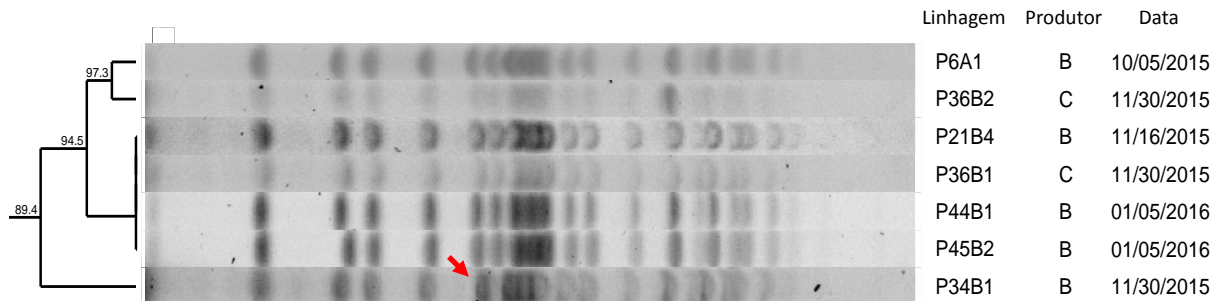


Figura 7 – *Cluster* das linhagens de carnes de frango da França identificado na **Figura 6** pelo retângulo vermelho. Apesar de a linhagem P34B1 apresentar similaridade menor que 90% com as linhagens do *cluster* (89,4%), é possível observar que ela apresenta, claramente, 1 banda de diferença das demais (seta vermelha).



5.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA)

5.4.1 TSA nas linhagens de *E. coli* isoladas de carnes e do TGI de frangos do Brasil e de carnes de frango da França

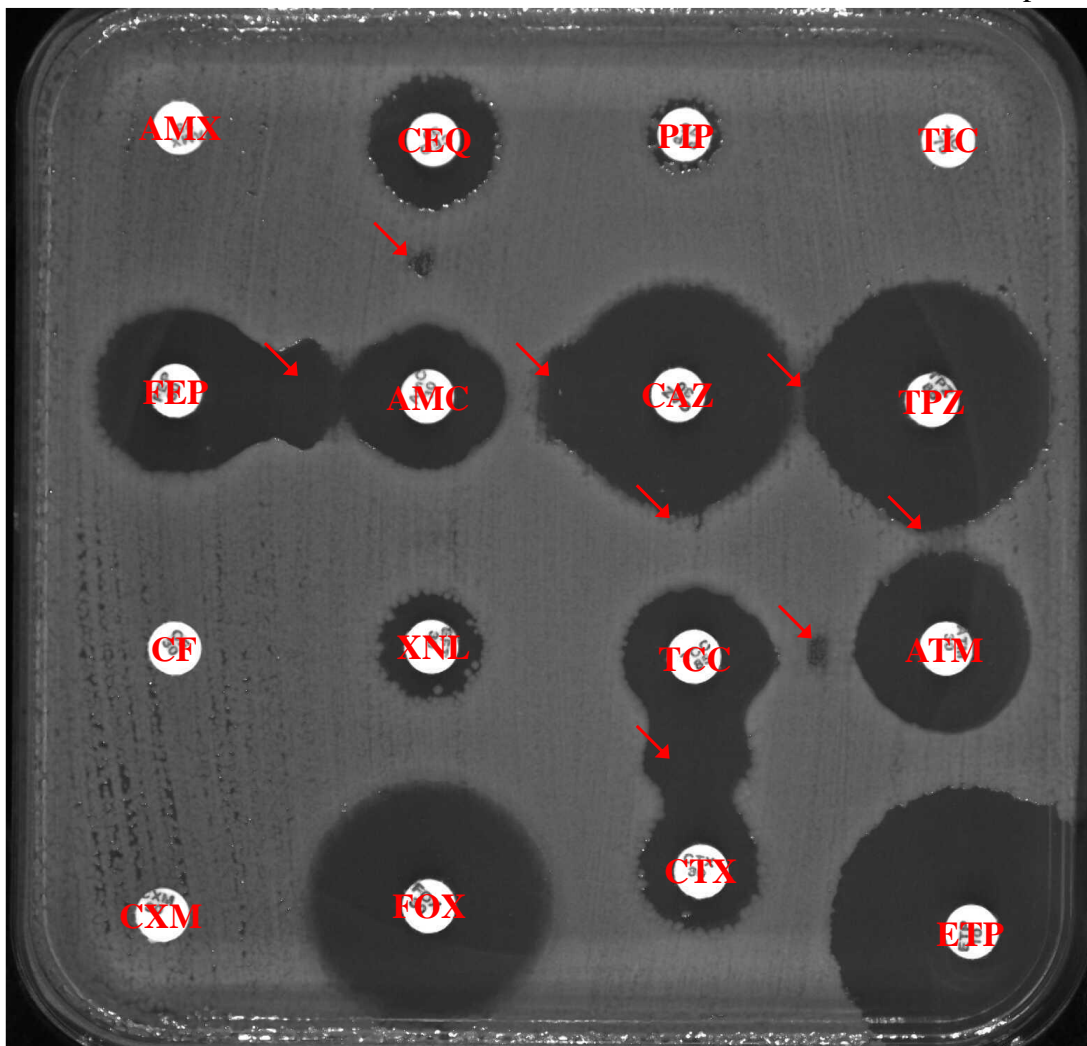
O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 60 linhagens brasileiras de *E. coli* selecionadas para o estudo são apresentados no **Apêndice B**. Com relação ao teste fenotípico para confirmação da produção de ESBL, 86,7% das linhagens apresentaram resultado positivo (**Figura 8**). As linhagens que apresentaram resultado negativo foram as obtidas de frangos da Fazenda 3.

Todas as linhagens apresentaram resistência às ESC cefotaxima e ceftiofur, exceto a linhagem CFCTX23, que apresentou resistência intermediária ao ceftiofur (um antimicrobiano análogo à ceftriaxona para uso veterinário). Apenas 18,3% das linhagens apresentaram resistência à ceftazidima. Em relação às cefalosporinas de quarta geração, exceto a linhagem CFCTX23 e as linhagens da Fazenda 3, as demais 51 linhagens apresentaram resistência à cefquinoma (análogo à cefepima para uso veterinário), e, destas, 33 (64,7%) apresentaram resistência também à cefepima. Quanto aos monobactâmicos, 45,0% das linhagens apresentaram resistência ao aztreonam. Somente 8 linhagens (13,3%), todas da Fazenda 3, apresentaram resistência à cefoxitina. Não foi detectada resistência ao carbapenêmico ertapenem em nenhuma linhagem proveniente de amostras do Brasil.

A resistência aos aminoglicosídeos (principalmente à estreptomicina) foi observada em 78,3% das linhagens, seguida pela resistência às sulfonamidas em 76,7% e à tetraciclina em 75,0%, às quinolonas, em 65,0%, ao trimetoprim, em 26,7%, e resistência ao cloranfenicol em

13,3%. Não foi detectada resistência à colistina em nenhuma das linhagens do Brasil analisadas (Apêndice B).

Figura 8 – Exemplo de resultado de TSA e Teste fenotípico de ESBL. As setas vermelhas apontam as “zonas fantasmas” ou o alargamento do halo de inibição do antimicrobiano, onde houve inibição da β -lactamase da bactéria testada pelos inibidores de β -lactamases, impedindo o crescimento bacteriano. AMX: amoxicilina; CEQ: cefquinoma; PIP: piperacilina; FEP: cefepima; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; CAZ: ceftazidima; TPZ: piperacilina/tazobactam; CF: cefalotina; XNL: ceftiofur; TCC: ticarcilina/ácido clavulânico; ATM: aztreonam; CXM: cefuroxima; FOX: cefoxitina; CTX: cefotaxima; ETP: ertapenem.



O Apêndice C apresenta o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentado pelas 77 linhagens de *E. coli* resistentes a ESC isoladas de carnes de frango, que foram selecionadas após a tipagem molecular.

Com relação ao teste fenotípico para confirmação da produção de ESBL, 74 linhagens (96,1%) resistentes a ESC isoladas de carnes de frango apresentaram resultado positivo. À

exceção de duas linhagens (P1A1 e P31A1), todas as demais (97,4%) apresentaram resistência à, no mínimo, uma entre as ESC testadas, sendo a resistência à cefotaxima e ao ceftiofur as mais comuns (94,8% e 88,3%, respectivamente, do total de 77 linhagens), e alguns casos de resistência à ceftazidima (6,5%). As linhagens P1A1 e P31A1 apresentaram resistência intermediária à cefotaxima e à ceftazidima, e P31A1 também ao ceftiofur. Em relação às cefalosporinas de quarta geração, 83,1% apresentaram resistência à cefepima e à ceftinoma, sendo que não houve uma linhagem resistente à primeira e não à segunda. Apenas 18,9% das linhagens apresentaram resistência ao aztreonam, e 4 (3,8%) à cefoxitina. Não foi detectada resistência ao ertapenem.

Foi observada resistência às sulfonamidas em 84,4% das linhagens, seguida pela resistência à tetraciclina em 75,3%, ao trimetoprim, em 52,0%, resistência às quinolonas testadas em 42,9%, aos aminoglicosídeos, em 29,9% (não tendo sido observada resistência à amicacina, à apramicina e à netilmicina), e aos fenicóis, em 14,9%. Também não foi detectada resistência à colistina nas linhagens francesas (**Apêndice C**).

A **Tabela 1** mostra as porcentagens de linhagens que apresentaram resistência às diferentes classes de antimicrobianos provenientes da cadeia produtora de frangos (linhagens isoladas de carnes e do TGI de frangos no Brasil, e linhagens de carnes de frango da França). Todas as linhagens isoladas de carnes e TGI de frangos do Brasil apresentaram resistência à, ao menos, uma ESC, enquanto 97,4% das linhagens isoladas de carnes de frango da França foram resistentes a ESC. As linhagens P1A1 e P31A1, isoladas de carnes de frango da França, apresentaram resistência intermediária às ESC.

Comparando-se, somente, as linhagens isoladas de carnes e do TGI de frangos do Brasil, observa-se uma marcante diferença na porcentagem de linhagens resistentes ao cloranfenicol, ao qual quase 40% das linhagens de carnes são resistentes, contra apenas 3% das linhagens isoladas de cloacas (**Tabela 1**). Também é observada diferença, ainda na comparação de linhagens provenientes de carnes e do TGI de frangos, na porcentagem de linhagens que apresentaram resistência aos aminoglicosídeos (94,4% e 71,4%, respectivamente), às quinolonas (88,9% e 54,8%, respectivamente) e às sulfonamidas (94,4% e 69,0%, respectivamente). Já a porcentagem de linhagens resistentes à tetraciclina e ao trimetoprim foram semelhantes (em torno de 75,0% e de 27,0%, respectivamente) (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Frequência (%) de linhagens de *E. coli* que apresentaram resistência às diferentes classes de antimicrobianos em cada tipo de amostra (carnes e TGI de frangos do Brasil e carnes de frango da França).

Classe de antimicrobiano	Brasil				Carnes	França
	Tratos gastrointestinal					Carnes de frango
	Fazenda 1	Fazenda 2	Fazenda 3	Total		
ESC ^a	21 (100)	13 (100)	8 (100)	42 (100)	18 (100)	75 (97,4)
Aminoglicosídeos ^b	19 (90,5)	10 (76,9)	1 (12,5)	30 (71,4)	17 (94,4)	23 (29,9)
Fenicolis ^c	1 (4,8)	0	0	1 (2,9)	7 (38,9)	11 (14,9)
Quinolonas ^d	13 (61,9)	10 (76,9)	0	23 (54,8)	16 (88,9)	33 (42,9)
Sulfonamidas	20 (95,2)	8 (61,5)	1 (12,5)	29 (69,0)	17 (94,4)	65 (84,4)
Tetraciclina	20 (95,2)	10 (76,9)	1 (12,5)	31 (73,8)	14 (77,8)	58 (75,3)
Trimetoprim	10 (47,6)	1 (7,7)	0	11 (26,2)	5 (27,8)	40 (51,9)

^a ESC = cefalosporinas de espectro estendido.

^b As linhagens isoladas no Brasil não apresentaram resistência somente à amicacina, enquanto que linhagens da França não apresentaram resistência à amicacina, à apramicina e à netilmicina.

^c As linhagens do Brasil apresentaram resistência somente ao cloranfenicol, e linhagens da França apresentaram resistência tanto ao cloranfenicol quanto ao florfenicol.

^d A classe “Quinolonas” considera o ácido nalidíxico e as fluoroquinolonas enrofloxacina e ofloxacina.

Comparando, apenas, as linhagens provenientes do TGI de frangos nas três fazendas no Estado de São Paulo, observa-se, claramente, uma maior porcentagem de linhagens resistentes aos antimicrobianos não β -lactâmicos isoladas nas Fazendas 1 e 2 em relação às linhagens isoladas na Fazenda 3 (**Tabela 1**). Apenas a linhagem F106Bx, isolada na Fazenda 3, apresentou resistência a aminoglicosídeos, tetraciclina e sulfonamidas (**Apêndice B**).

Ao compararmos a porcentagem de linhagens que apresentaram resistência aos antimicrobianos não β -lactâmicos isoladas de carnes de frangos do Brasil e da França, fica evidente a diferença, principalmente em relação aos aminoglicosídeos, mas também às quinolonas, aos fenicolis e ao trimetoprim (**Tabela 1**). A porcentagem de linhagens resistentes às sulfonamidas e à tetraciclina são semelhantes. Excetuando a resistência ao trimetoprim (52,0% das linhagens isoladas na França e 27,8% das linhagens de carnes de frango do Brasil), a porcentagem de linhagens resistentes às demais classes de antimicrobianos foi sempre maior nas linhagens isoladas de carnes do Brasil do que nas de carnes da França (**Tabela 1**).

5.4.2 TSA nas linhagens de *E. coli* isoladas de carnes de coelho da França

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 2 linhagens de *E. coli* isoladas a partir de carnes de coelho estão apresentados no **Apêndice D**. Tanto L5A1 quanto L7B1 apresentaram resistência à ceftazidima. Somente L7B1 apresentou resistência à cefotaxima, e ambas apresentaram resistência intermediária ao ceftiofur. As duas linhagens apresentaram sensibilidade à cefepima e à cefquinoma, porém, resistência ao aztreonam. L7B1 apresentou também resistência intermediária à cefoxitina. Nenhuma das duas linhagens apresentou resistência ao ertapenem, e foram positivas para o teste fenotípico de produção de ESBL.

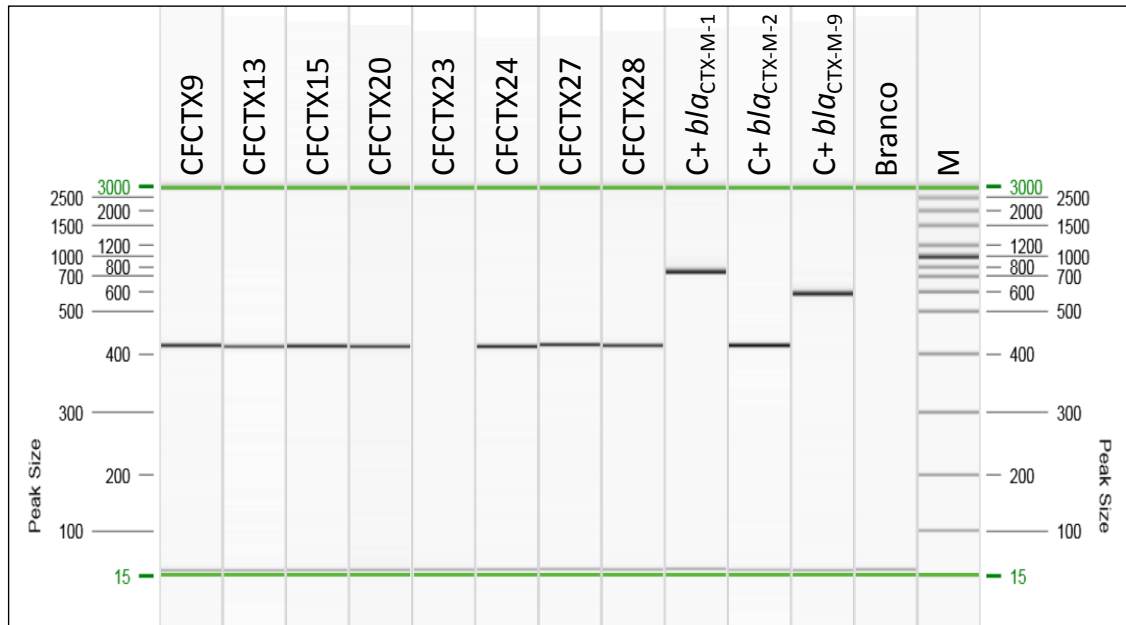
A linhagem L5A1, adicionalmente, apresentou resistência à estreptomicina, ao cloranfenicol, à tetraciclina, às sulfonamidas e às quinolonas testadas, enquanto L7B1 apresentou apenas resistência à ofloxacina, e resistência intermediária ao ácido nalidíxico e à enrofloxacina.

5.5 Detecção e identificação dos genes de resistência a ESC

5.5.1 Genes *bla* nas linhagens de *E. coli* isoladas de carnes e cloaca de frangos do Brasil

A **Figura 9** ilustra um resultado de Multiplex-PCR para a detecção dos genes de *bla*_{CTX-M-grupo 1, -grupo 2 e -grupo 9}. O **Quadro 1** mostra a diversidade de genes de resistência a ESC identificados nas 60 linhagens de *E. coli* isoladas de carnes e do TGI de frangos do Brasil. Dentre as 18 linhagens isoladas de carnes, o gene *bla*_{CTX-M-2} foi predominante, presente em 15 linhagens (83,3%) isoladas de todas as cinco amostras de carne. O gene *bla*_{CTX-M-15} foi identificado em duas linhagens (11,1%) de uma mesma amostra de carne, e o gene *bla*_{CTX-M-8} em apenas uma linhagem (5,6%). Apesar deste estudo não apresentar grande abrangência, a contaminação de carnes com *E. coli* carreadoras de outros genes que não *bla*_{CTX-M-2} parece ser pontual (**Quadro 1**). Observa-se, também, que diferentes linhagens de *E. coli* foram isoladas a partir de uma mesma amostra de carne, inclusive, algumas carreando genes *bla* diferentes (**Quadro 1**).

Figura 9 – Exemplo de eletroforese, utilizando o aparelho QIAxcel, da multiplex-PCR para detecção de *bla*_{CTX-M}-grupo 1, -grupo 2 e -grupo 9. Branco: tubo sem a adição de qualquer DNA; M: marcador de peso molecular padrão.



Com relação às 42 linhagens isoladas do TGI de frangos, o gene *bla*_{CTX-M-2} também predominou, sendo detectado em 26 linhagens (61,9%), e presente apenas nas fazendas 1 e 2. O gene *bla*_{CTX-M-55} foi detectado em 7 linhagens (16,7%), apenas na Fazenda 2, e o gene *bla*_{CMY-2} foi detectado apenas nas 8 linhagens (19,0%) da Fazenda 3. A linhagem F13Bx (2,4%), positiva no teste fenotípico de ESBL, não apresentou nenhum dos genes investigados pela metodologia empregada (**Quadro 1**).

Também observa-se que diferentes linhagens de *E. coli* foram isoladas a partir do TGI de uma mesma ave, e algumas carregando genes *bla* diferentes, como na Fazenda 2 (**Quadro 1**).

Quadro 1 – Filogrupos de *E. coli*, genes *bla* e contexto genético nas 60 linhagens do Brasil.

Linhagem	Filogrupo	Gene <i>bla</i> ¹	Plasmídeos ²		Ambiente genético dos genes <i>bla</i> ³
			Tamanho (kb)	Grupo Inc	
CFCTX9	A1	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
CFCTX13	D2	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
CFCTX15	D2	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
CFCTX20	A0	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
CFCTX23	A0	CTX-M-8	100	II	IS10- <i>bla</i>
CFCTX24	B1	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
CFCTX27	D2	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
CFCTX28	D2	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
CFCTX30	B2.3	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
CFCTX36	B1	CTX-M-15	55	XI	ISEcp1- <i>bla</i>
CFCTX37	D2	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
CFCTX39	D2	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
CFCAZ3	B1	CTX-M-15	---	---	ISEcp1- <i>bla</i>
CFCTX44	D2	CTX-M-2	---	---	ISCRI- <i>bla</i>
CFCTX53	D1	CTX-M-2	---	---	ISCRI- <i>bla</i>
CFCTX55	D2	CTX-M-2	---	---	ISCRI- <i>bla</i>
CFCTX57	A1	CTX-M-2	242,5	HI2/P	ISCRI- <i>bla</i>
CFCTX58	D2	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-dfrA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F1Bx	D1	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F4Ax	A0	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-dfrA-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F4Bx	A1	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F7Bx	B1	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-dfrA-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F13Ax	D1	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadB-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F13Bx*	A1	ESBL+	---	---	---
F14Dx	A0	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-dfrA-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F15Bx	A0	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-dfrA-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F17Bx	A1	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F20Bx	D1	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadB-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F21Ax	D1	CTX-M-2	---	---	---
F21Bx	B1	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-dfrA-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F23x	D2	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-dfrA-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F24x	D2	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F25Bx	D1	CTX-M-2	---	---	---
F26Bx	D2	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-dfrA-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F28Ax	D2	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F31ABx	D1	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadB-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F35Ax	A1	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F35Bx	A0	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-dfrA-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F37x	A0	CTX-M-2	---	---	---
F42Cx	D2	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F49Bx	B1	CTX-M-55	100	N/FII	ISEcp1- <i>bla</i>
F56Ax	D2	CTX-M-55	110	N/FII	ISEcp1- <i>bla</i>
F58x	A1	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F59Bx	D2	CTX-M-55	100	N/FII	ISEcp1- <i>bla</i>
F60Bx	A1	CTX-M-55	100	N/FII	ISEcp1- <i>bla</i>
F61Bx	A0	CTX-M-2	---	---	---
F61Cx	D2	CTX-M-55	100	N/FII	ISEcp1- <i>bla</i>
F66Ax1	D1	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadB-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F66Bx	A1	CTX-M-55	90	FII	ISEcp1- <i>bla</i>
F68Bx	D2	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F69Ax	D1	CTX-M-2	---	---	<i>Int11-aadB-aadA-qacEA1-sul1-ISCRI-bla-qacEA1</i>
F71Bx	D2	CTX-M-55	100	N/FII	ISEcp1- <i>bla</i>
F75x	D1	CMY-2	90	---	ISEcp1- <i>bla</i>
F77Bx	D1	CMY-2	90	---	ISEcp1- <i>bla</i>
F81Bx	D1	CMY-2	90	---	ISEcp1- <i>bla</i>
F91Ax	D1	CMY-2	90	---	ISEcp1- <i>bla</i>
F94x	A1	CMY-2	90	---	ISEcp1- <i>bla</i>
F106Bx	D1	CMY-2	90	---	ISEcp1- <i>bla</i>
F109x	A1	CMY-2	90	---	ISEcp1- <i>bla</i>
F117Bx	D1	CMY-2	90	---	ISEcp1- <i>bla</i>

¹ Os genes *bla* estão marcados com cores unicamente para diferenciar os grupos de genes *bla*.

² São apresentados apenas os plasmídeos caracterizados por *Southern blot*/Hibridação ou PBRT, e estão marcados com as mesmas cores dos genes que carregam para facilitar a comparação. Nas demais linhagens, não foi possível identificar o plasmídeo carreador do gene *bla*.

³ Não foi possível determinar o ambiente genético de alguns genes *bla*, identificados com “---”.

* A linhagem F13Bx foi positiva no teste fenotípico de ESBL, porém não foi identificado o gene responsável pelo fenótipo com a metodologia utilizada. Por essa razão, não foram realizados experimentos de caracterização de contexto genético nesta linhagem.

5.5.2 Genes *bla* nas linhagens de *E. coli* isoladas de carnes de frango e de coelho da França

O **Quadro 2** mostra a diversidade de genes de resistência a ESC identificados nas 77 linhagens de *E. coli* isoladas de carnes de frango na França. O gene *bla*_{CTX-M-1} foi predominante, presente em 68 linhagens (88,3%). Os demais genes foram identificados como se segue: *bla*_{TEM-52} em 5 linhagens (6,5%), sendo duas delas isoladas de uma mesma amostra de carne; *bla*_{CMY-2} em 3 linhagens (3,9%); e *bla*_{SHV-12} em apenas 1 linhagem (1,3%).

Diferentes linhagens de *E. coli* foram isoladas a partir de uma mesma amostra de carne de frango, e algumas carregando genes *bla* diferentes (**Quadro 2**).

A linhagem P7A1 amplificou um gene *bla*_{CTX-M-grupo 1} e, após sequenciamento de ambas as fitas, foi identificada uma mutação Q96L na sequência peptídica quando comparada à da enzima CTX-M-1.

Ambas as linhagens isoladas de carnes de coelho apresentaram o gene *bla*_{SHV-12}.

Quadro 2 – Grupo filogenético, gene *bla*, tamanho e grupo de incompatibilidade dos plasmídeos das 77 linhagens de carnes de frango da França.

Linhagem	Filogrupa	Gene <i>bla</i> ¹	Plasmídeos ²	
			Tamanho (kb)	Grupo Inc
P1A1	A1	TEM-52	100	I1 conjug
P1B1	B1	CTX-M-1	120	I1 conjug
P2B1	A0	CTX-M-1	110	I1
P3B1	B1	CTX-M-1	100	I1
P3B2	B1	CTX-M-1	100	I1
P4A1	A1	CTX-M-1	110	I1
P5A1	B1	CTX-M-1	120	FII não conjug
P6A1	D2	CTX-M-1	110	I1
P6B1	D2	CTX-M-1	100	I1
P7A1	D1	CTX-M-1*	120	I1 conjug
P7B1	A1	CTX-M-1	100	I1
P7B2	A0	CTX-M-1	97	I1
P8B2	B1	CTX-M-1	120	I1
P8B3	A0	CTX-M-1	97	I1
P9A1	A0	CTX-M-1	146	FII não conjug
P10A1	B1	CTX-M-1	118	I1
P11B1	B1	CTX-M-1	120	I1
P11B2	D2	CTX-M-1	118	I1
P12A1	B1	CTX-M-1	120	I1
P14A1	A1	CTX-M-1	100	I1
P15A1	A1	CTX-M-1	105	I1
P15B2	B1	CTX-M-1	110	I1
P15B3	B2.3	CMY-2	165	A/C não conjug
P16B1	A1	CTX-M-1	105	I1
P16B3	B1	CTX-M-1	110	I1 não conjug
P18B1	D2	CTX-M-1	97	I1

Linhagem	Filogrupa	Gene <i>bla</i> ¹	Plasmídeos ²	
			Tamanho (kb)	Grupo Inc
P18B2	B1	CTX-M-1	100	I1
P19A1	B1	SHV-12	130	I1 conjug
P19B1	A1	CMY-2	165	A/C não conjug
P20A1	B1	CTX-M-1	115	I1
P20B1	D1	CMY-2	90	K conjug
P20B3	D2	CTX-M-1	110	I1 conjug
P21A1	B2.3	CTX-M-1	110	I1 conjug
P21B1	B1	CTX-M-1	110	I1 conjug
P21B4	D2	CTX-M-1	110	I1
P22A1	D2	CTX-M-1	110	I1
P23B1	B1	CTX-M-1	105	I1 não conjug
P25B1	B1	CTX-M-1	110	I1
P26A1	D1	TEM-52	45	X1 conjug
P27A1	D2	CTX-M-1	110	I1
P28A1	A0	CTX-M-1	110	I1
P29A1	B1	CTX-M-1	110	I1
P30B1	A1	CTX-M-1	120	I1
P30B2	A1	CTX-M-1	110	I1
P31A1	B1	TEM-52	45	X1 conjug
P31B1	A1	CTX-M-1	110	I1 conjug
P31B2	D1	TEM-52	45	X1 conjug
P32A1	A1	CTX-M-1	110	I1
P33A1	A1	CTX-M-1	120	I1
P34A1	D2	CTX-M-1	195	I1 não conjug
P34B1	D2	CTX-M-1	115	I1
P35A1	B1	CTX-M-1	110	I1

Linhagem	Filogrupa	Gene <i>bla</i> ¹	Plasmídeos ²	
			Tamanho (kb)	Grupo Inc
P36A1	A0	CTX-M-1	150	FII não conjug
P36B1	D2	CTX-M-1	110	I1
P38A1	D2	CTX-M-1	110	I1 conjug
P38B1	A1	CTX-M-1	105	I1
P39A1	D2	CTX-M-1	105	I1
P39B2	B1	CTX-M-1	115	I1
P40A1	D1	CTX-M-1	105	I1
P40B2	A0	CTX-M-1	100	I1
P41A1	B2.2	CTX-M-1	105	I1 conjug
P41B2	D2	CTX-M-1	105	I1 conjug
P42A1	D1	CTX-M-1	105	I1
P42A2	D1	CTX-M-1	120	I1
P42B1	A0	CTX-M-1	110	I1
P43A1	D2	CTX-M-1	110	I1
P43B2	A1	CTX-M-1	110	I1
P44A1	A1	CTX-M-1	110	I1 conjug
P44B1	D2	CTX-M-1	110	I1
P45A1	A0	CTX-M-1	110	I1
P45B1	D1	CTX-M-1	110	I1
P45B2	D2	CTX-M-1	110	I1
P46B1	D2	CTX-M-1	110	I1 conjug
P47A1	A0	TEM-52	100	I1 conjug
P47B1	B1	CTX-M-1	110	I1
P48A1	D1	CTX-M-1	105	I1
P48B1	B1	CTX-M-1	105	I1 conjug

¹ Os genes e os plasmídeos que os carregam estão marcados com cores diferentes unicamente para diferenciar as famílias de genes *bla* e facilitar a comparação.

² Os plasmídeos estão marcados com as mesmas cores dos genes que carregam para facilitar a comparação, e foram identificados por *Southern blot*/Hibridação ou PBRT. Plasmídeos submetidos ao ensaio de conjugação estão marcados com seus resultados “conjug” = conjugativo, ou “não conjug” = não conjugativo.

* O gene *bla*_{CTX-M} da linhagem P7A1 não é completamente similar a *bla*_{CTX-M-1}, apresentando uma mutação Q96L.

5.6 Ambiente genético dos genes *bla* e caracterização dos plasmídeos quanto à capacidade de conjugação, ao tamanho e ao grupo de incompatibilidade

5.6.1 Contexto genético nas linhagens de *E. coli* isoladas de carnes e do TGI de frangos do Brasil

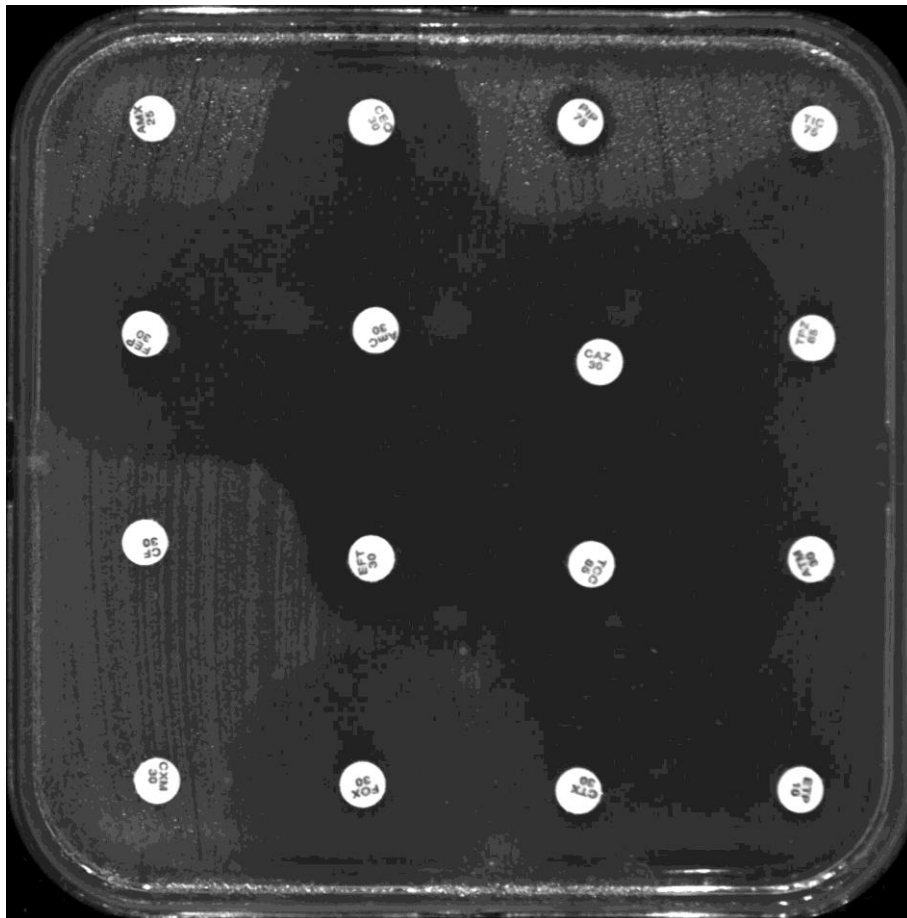
O **Quadro 1 – p. 71** apresenta também o contexto genético dos genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CMY-2} identificados nas linhagens de *E. coli* do Brasil. Todos os genes *bla*_{CTX-M-grupo 1} (*bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-55}) e *bla*_{CMY-2} estão precedidos pela sequência de inserção *ISEcp1*. Os genes *bla*_{CTX-M-2} estão todos *downstream* à *ISCR1* e, a maioria, foi detectada inserida em integrons de classe 1 complexos. Não foi possível detectar se *ISCR1-bla*_{CTX-M-2} nas linhagens CFCTX44, CFCTX53, CFCTX55 e CFCTX57 estão inseridos em integron de classe 1 complexo, como os demais. As linhagens provenientes de amostras de carne do Brasil apresentaram somente um gene *aadA* na região variável do integron, exceto CFCTX58, que apresentou um gene *dfrA*. Quanto às linhagens carreadoras de *bla*_{CTX-M-2} provenientes do TGI de frangos, os cassetes gênicos inseridos no integron variaram entre somente o gene *aadA*, ou os pares de genes *dfrA+aadA* e *aadB+aadA*. Em relação ao *bla*_{CTX-M-8} na linhagem CFCTX23, foi detectada a *IS10* *upstream* ao gene.

Nas linhagens de *E. coli* isoladas no Brasil, o ensaio de transferência de plasmídeo por conjugação em meio líquido foi realizado anteriormente à caracterização dos plasmídeos, exatamente para facilitar a identificação dos mesmos, caso transferidos. A conjugação foi bem sucedida para todas as linhagens carreadoras do gene *bla*_{CTX-M-55}, e para as linhagens CFCTX23, carreadora de *bla*_{CTX-M-8}, CFCTX36, carreadora de *bla*_{CTX-M-15}, e CFCTX57, carreadora de *bla*_{CTX-M-2}, sendo confirmados pelo TSA (**Figura 10**) e pela PCR para detecção dos grupos de *bla*_{CTX-M}. Nenhuma outra linhagem carreadora de *bla*_{CTX-M-2} transferiu o plasmídeo por conjugação pela metodologia laboratorial utilizada.

As cepas de *E. coli* K12 J53 transconjugantes carreadoras de *bla*_{CTX-M-15} (CFCTX36^{TC}), *bla*_{CTX-M-55} (F49Bx^{TC}, F56Ax^{TC}, F59Bx^{TC}, F60Bx^{TC}, F61Cx^{TC}, F66Bx^{TC} e F71Bx^{TC}) e *bla*_{CTX-M-8} (CFCTX23^{TC}) não apresentaram nenhuma resistência adicional a outros antimicrobianos que não as determinadas pelas variantes do gene *bla*_{CTX-M} (**Apêndice E**). Ainda, CFCTX23^{TC} apresentou sensibilidade ao ceftiofur e resistência intermediária à cefotaxima (**Apêndice E**), o que indica uma baixa atividade deste *bla*_{CTX-M-8}, já evidenciada no TSA da linhagem selvagem CFCTX23, que apresentou resistência reduzida à cefotaxima e intermediária ao ceftiofur (**Apêndice B**). A transconjugante CFCTX57^{TC} apresentou resistência adicional à canamicina e

à tetraciclina (**Apêndice E**), além de redução da sensibilidade aos aminoglicosídeos estreptomicina e gentamicina, observando que a linhagem selvagem CFCTX57 também era resistente a ambos antimicrobianos (**Apêndice B**).

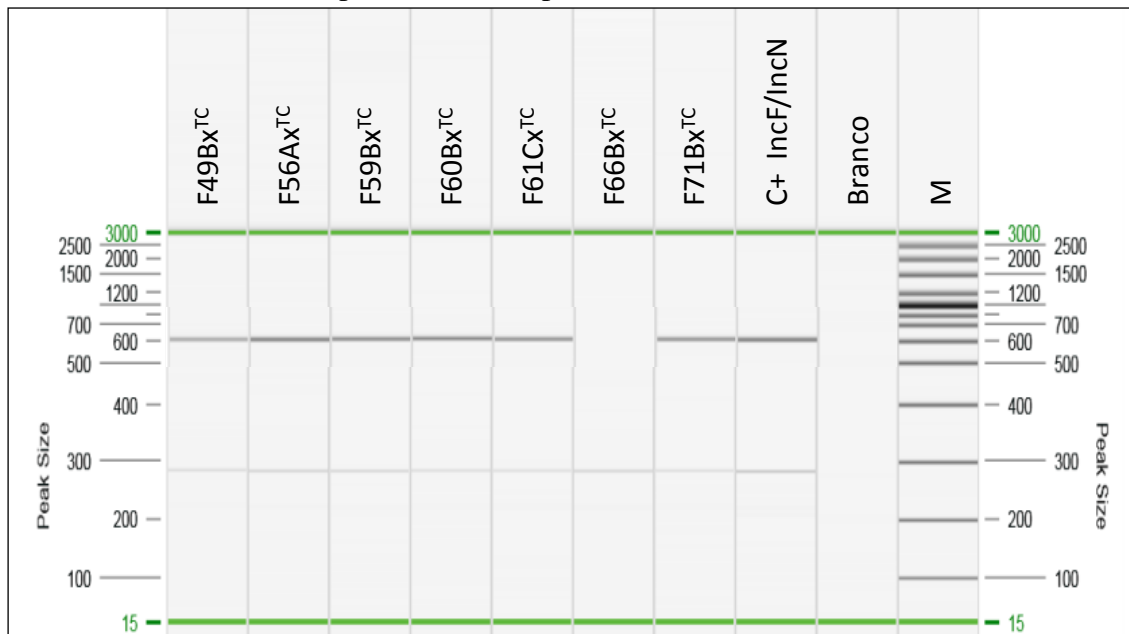
Figura 10 – Exemplo de resultado de TSA em uma cepa *E. coli* K12 J53 transconjugante com linhagem carreadora de *bla*_{CTX-M-2}. Como os discos com antimicrobianos estão sempre nas mesmas posições nos TSA realizados no AVB-ANSES, este formato de crescimento bacteriano é típico de cepas transconjugantes com genes *bla*_{CTX-M}.



Com relação às linhagens que transferiram o plasmídeo carreador do gene *bla* por conjugação, os mesmos foram subsequentemente caracterizados quanto ao tamanho e grupo de incompatibilidade por PBRT e *Southern blot*.

Como observado no **Quadro 1 – p. 71**, a linhagem CFCTX23 porta o gene *bla*_{CTX-M-8} em um plasmídeo IncII de 100 kb, CFCTX36 apresenta o gene *bla*_{CTX-M-15} carreado por um plasmídeo IncX1 de 55 kb, e CFCTX57 carrega *bla*_{CTX-M-2} em um plasmídeo multireplicon IncHI2/P de 242,5 kb. Quanto aos sete *bla*_{CTX-M-55} detectados, seis são carreados por plasmídeos multireplicons IncN/FII, sendo cinco de 100 kb e um de 110 kb; a linhagem F66Bx carrega o *bla*_{CTX-M-55} em um plasmídeo IncFII de 90 kb (**Quadro 1 – p. 71; Figuras 11 e 12**).

Figura 11 – Exemplo de eletroforese, utilizando o aparelho QIAxcel, da tipagem de plasmídeos pelo esquema PBRT nas cepas transconjugantes do gene *bla*_{CTX-M-55}. Branco: tubo sem a adição de DNA; M: marcador de peso molecular padrão.

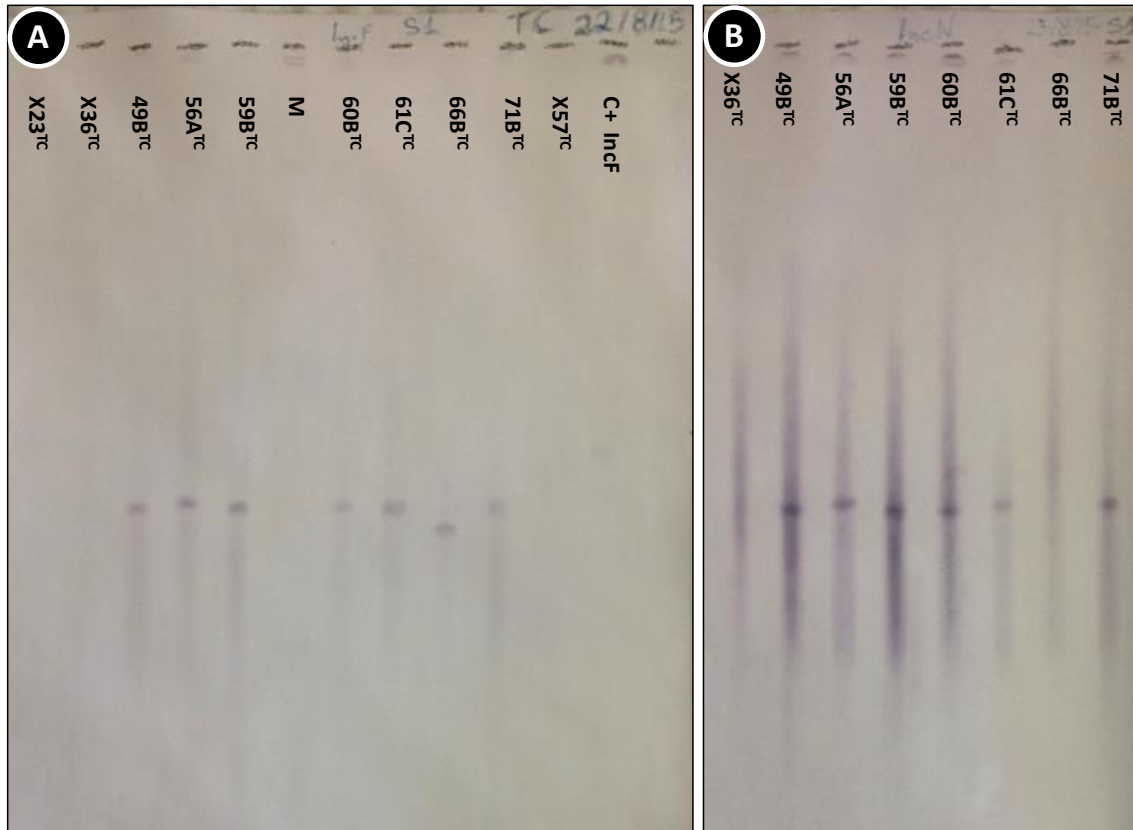


As linhagens da Fazenda 3, carreadoras de *bla*_{CMY-2}, também não transferiram o gene por conjugação. Pela técnica de *Southern blot* nas linhagens selvagens, foi possível identificar que os *bla*_{CMY-2} são carreados por plasmídeos de 90 kb, mas não foi determinado o Inc dos mesmos.

A linhagem F13Bx não foi submetida à análise de ambiente genético, uma vez que o gene responsável pelo fenótipo de ESBL não foi identificado.

As demais linhagens do estudo que não transferiram o plasmídeo portador do gene *bla* por conjugação (CFCAZ3, portadora de *bla*_{CTX-M-15}, e todas as linhagens carreadoras de *bla*_{CTX-M-2}, exceto CFCTX57) foram submetidas à PFGE-S1 seguida de *Southern blot*, porém a aplicação desta técnica não resultou em êxito para a identificação da localização plasmidial de nenhuma delas. A técnica de PFGE-I-CeuI seguida de *Southern blot* foi utilizada visando confirmar a presença dos genes *bla* no cromossomo dessas linhagens, mas, após diversas tentativas, os resultados não foram satisfatórios (**Figura 13**).

Figura 12 – Exemplo de *Southern blot* de cepas transconjugantes. **a)** sonda para detecção de IncFII; **b)** sonda para detecção de IncN. M: posição do marcador de peso molecular padrão no gel de PFGE; C+ IncF: linhagem do banco de cepas do AVB-ANSES, Lyon previamente caracterizada como positiva para IncFII.



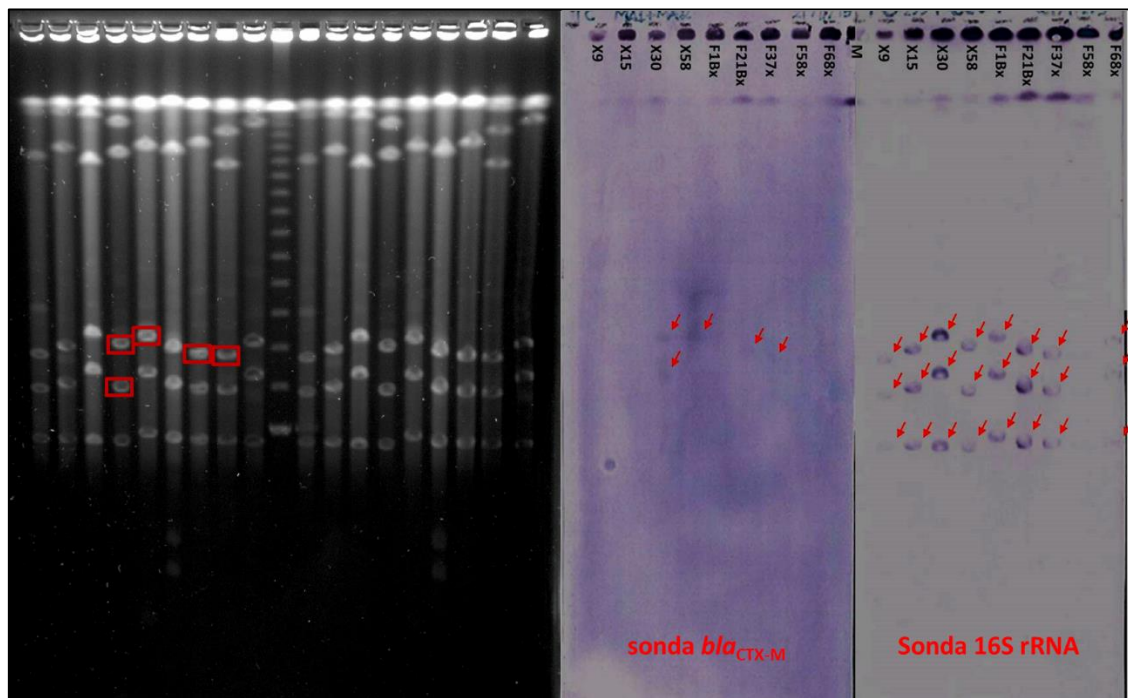
5.6.2 Contexto genético nas linhagens de *E. coli* de carnes de frango da França

Todos os *bla*_{CTX-M-1} das linhagens isoladas de carnes de frango da França estão precedidos por uma *ISEcp1*. Nos demais genes *bla* (*bla*_{TEM-52}, *bla*_{SHV-12} e *bla*_{CMY-2}) não foi investigada a região *upstream* dos genes.

Como observado no **Quadro 2 – p. 73**, 95,6% dos *bla*_{CTX-M-1} detectados estão carregados por plasmídeos IncII variando entre 97 kb e 120 kb, à exceção do plasmídeo da linhagem P34A1, de, aproximadamente, 195 kb. As outras três linhagens carreadoras de *bla*_{CTX-M-1} (P5A1, P9A1 e P36A1) portam os genes em plasmídeos do grupo de incompatibilidade FII, de tamanhos estimados em 120 kb, 146 kb e 150 kb (**Quadro 2 – p. 73**). Dois genes *bla*_{TEM-52} estão carregados por plasmídeos IncII de 100 kb, e os outros três, por plasmídeos IncX1 de 45 kb. Dois genes *bla*_{CMY-2} são carregados por plasmídeos multirreplicons IncA/C de 165 kb, e o outro *bla*_{CMY-2}, por um plasmídeo do grupo de incompatibilidade K de 90 kb. O único *bla*_{SHV-}

12 está sendo carregado por um plasmídeo IncII de, aproximadamente, 130 kb (**Quadro 2 – p. 73**).

Figura 13 – Técnicas de PGFE-I-CeuI e Southern blot/Hibridação com sondas para *bla*_{CTX-M} e *rrn* (16S rRNA) em linhagens selvagens que não conjugaram. O resultado da Hibridação com a sonda para *bla*_{CTX-M} não é satisfatório, com marcações de bandas muito fracas.



Nas linhagens da França, o ensaio de conjugação foi realizado após a caracterização dos plasmídeos. Assim, das 18 linhagens carreadoras do gene *bla*_{CTX-M-1} submetidas ao teste de conjugação plasmideal em meio líquido, a maioria foi selecionada ao acaso. Porém, P5A1, P9A1 e P36A1 foram selecionadas por apresentarem plasmídeo de grupo de incompatibilidade FII, diferindo das demais linhagens carreadoras de *bla*_{CTX-M-1} em plasmídeos IncII; P34A1 foi selecionada por apresentar um plasmídeo IncII de 195 kb, diferindo dos demais de, aproximadamente, 110 kb; e P7A1 foi selecionada por apresentar o gene de ESBL semelhante, mas não idêntico, a *bla*_{CTX-M-1} (**Quadro 2 – p. 73**). As demais nove linhagens carreadoras dos outros genes *bla* (5 *bla*_{TEM-52}, 3 *bla*_{CMY-2} e 1 *bla*_{SHV-12}) foram todas submetidas ao ensaio de conjugação.

Das linhagens portadoras de *bla*_{CTX-M-1}, 12 transferiram o plasmídeo carreador do gene por conjugação. Das seis restantes, três apresentavam plasmídeo do grupo de incompatibilidade FII, e uma outra foi a linhagem P34A1 que apresentou o plasmídeo IncII de 195 kb; as duas linhagens (P16B3 e P23B1) que não obtiveram sucesso na transferência do plasmídeo por conjugação carregavam o *bla*_{CTX-M-1} em plasmídeos IncII de 110 kb e 105 kb, respectivamente.

As cinco linhagens carreadoras de *bla*_{TEM-52}, uma linhagem carreadora de *bla*_{CMY-2} (P20B1), e a linhagem com *bla*_{SHV-12}, transferiram os respectivos plasmídeos por conjugação. Não foi obtido sucesso na conjugação dos plasmídeos carreadores de *bla*_{CMY-2} das linhagens P15B3 e P19B1 (**Quadro 2 – p. 73**).

No **Apêndice E** observa-se que as cepas transconjugantes P1B1^{TC} (*bla*_{CTX-M-1}), P19A1^{TC} (*bla*_{SHV-12}) e P46B1^{TC} (*bla*_{CTX-M-1}) apresentaram resistência também à tetraciclina e às sulfonamidas, e P21A1^{TC} (*bla*_{CTX-M-1}) apresentou resistência adicional às sulfonamidas e ao trimetoprim.

5.6.3 Contexto genético nas linhagens de *E. coli* isoladas a partir de carnes de coelho da França

O gene *bla*_{SHV-12} detectado na linhagem L5A1 de *E. coli* de carne de coelho é carregado por um plasmídeo IncI1 conjugativo de 120 kb, e a cepa de *E. coli* K12 J53 transconjugante L5A1^{TC} apresentou resistência adicional ao cloranfenicol, à tetraciclina e às sulfonamidas.

O *bla*_{SHV-12} da linhagem L7B1 de carne de coelho é carregado por um plasmídeo conjugativo de 50 kb que não pode ser tipado quanto ao Inc com as técnicas empregadas, e a cepa transconjugante L7B1^{TC} não apresentou resistência a nenhum outro antimicrobiano que não as já conferidas pelo *bla*_{SHV-12} na linhagem selvagem.

A região *upstream* dos *bla*_{SHV-12} de carne de coelho também não foi investigada.

5.7 Classificação das linhagens de *Escherichia coli* em grupos filogenéticos

5.7.1 Filogrupos das linhagens de *E. coli* isoladas de carnes e do TGI de frangos do Brasil

Dentre as 60 linhagens selecionadas, foram identificados representantes dos 4 principais grupos filogenéticos (**Quadro 1 – p. 71**). A maioria (56,7%) pertence ao filogrupo D (15 D₁ e 19 D₂), das quais 10 são provenientes de carnes (55,5% das linhagens de carne) e 24 do TGI de frangos (57,1% das linhagens de TGI). Em seguida, 31,7% das linhagens pertencem ao filogrupo A (8 A₀ e 11 A₁), das quais 4 são provenientes de carnes (22,2% das linhagens de carne) e 15 do TGI de frangos (35,7% das linhagens de TGI). Somente 10% das linhagens isoladas no Brasil pertenceram ao filogrupo B1, sendo 3 de carnes (16,7% das linhagens de carne) e 3 do TGI de frangos (7,1% das linhagens de TGI). Apenas 1 linhagem, isolada de carne

de frango (5,5% das linhagens de carne, e 1,7% do total de linhagens selecionadas), pertence ao filogrupo B2 (**Quadro 1 – p. 71**).

5.7.2 Filogrupo das linhagens de *E. coli* isoladas de carnes de frango e de coelho da França

Dentre as 77 linhagens isoladas a partir de carnes de frango da França, também foram identificados representantes dos 4 principais grupos filogenéticos de *E. coli* (**Quadro 2 – p. 73**). A taxa de isolamento de representantes dos filogrupos D (35,1%), A (32,5%) e B1 (28,6%) foi similar. Dentre o filogrupo D, 18 linhagens pertencem ao subgrupo D₂, e 9 ao subgrupo D₁. Dentre o filogrupo A, 15 linhagens pertencem ao subgrupo A₁, e 10 ao subgrupo A₂. Do restante, somente 3 linhagens (3,9%) pertencem ao filogrupo B2, sendo 1 do subgrupo B2₂ e 2 B2₃ (**Quadro 2 – p. 73**).

Das duas linhagens de *E. coli* isoladas de carnes de coelho, L5A1 pertence ao filogrupo D₁, e L7B1, filogrupo B1.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 Isolamentos de *E. coli* resistentes a ESC no Brasil e na França

Estudos relatam porcentagens variadas de bactérias resistentes a ESC em carnes ou carcaças de frango (Cohen Stuart *et al.*, 2012; Egea *et al.*, 2012; Ghodousi *et al.*, 2015; Kawamura *et al.*, 2014; Koga *et al.*, 2015; Kola *et al.*, 2012; Zarfel *et al.*, 2014). Nesses estudos, o isolamento foi realizado utilizando-se a técnica de lavagem de superfície com água peptonada sem a adição de antimicrobianos. No presente estudo, o uso de água peptonada com antibióticos foi aplicado desde a primeira etapa, visando inibir o crescimento populacional de bactérias sensíveis que pudessem se multiplicar mais rapidamente e se sobreporem às resistentes e, assim, subestimar a presença destas últimas. Isso, porque, é sabido que plasmídeos de resistência conferem um alto custo energético à bactéria que não está submetida à pressão por antimicrobianos, reduzindo sua taxa de multiplicação (Vogwill e MacLean, 2015).

A alta porcentagem de carnes de frango do Brasil (100%) e da França (91,7%) contaminadas por *E. coli* resistentes a ESC é, de fato, preocupante, uma vez que clones bacterianos, plasmídeos e genes de resistência podem ser transferidos a partir dos frangos para os humanos pelo manuseio ou consumo das carnes devido à contaminação cruzada (EFSA, 2011; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Moyaert *et al.*, 2014). Assim, programas de monitoramento do uso de agentes antimicrobianos e da resistência bacteriana em animais de produção, alimentos e humanos são essenciais, se quisermos conter o avanço da resistência (Garcia-Migura *et al.*, 2014; Moyaert *et al.*, 2014).

No presente estudo, em 58,3% dos TGI de frango analisados havia *E. coli* resistentes a ESC, taxa bastante superior à encontrada em outro estudo realizado recentemente no Brasil, no qual foram isoladas *E. coli* resistentes a ESC em apenas 9,5% dos TGI de frango analisados (Ferreira *et al.*, 2014b). Na Europa, foram relatadas taxas maiores, como na Suíça (Geser, Stephan e Hächler, 2012) e Alemanha (Reich, Atanassova e Klein, 2013). No Japão foram detectadas *E. coli* resistentes a ESC em 100% dos TGI de frango analisados (Kameyama *et al.*, 2013).

A presença de *E. coli* resistentes a ESC no TGI de quase 60% dos frangos analisados também representa uma preocupação que deve ser avaliada juntamente com o isolamento dessas bactérias a partir de carnes destinada ao consumo humano. Com relação às linhagens do Brasil, houve similaridade entre algumas linhagens de uma amostra de carne e de TGI de frangos da Fazenda 3, sugerindo uma correlação da origem de carnes de frango com os animais de granjas

da região. Além disso, os resultados evidenciam que, assim como as carnes vendidas no varejo são veículos de *E. coli* carreadoras de genes de resistência, os animais de produção podem, de fato, atuar como reservatórios desses genes.

A presença de *E. coli* resistentes a ESC nas carnes de coelho da França foi inesperada, uma vez que, neste país, o uso de β -lactâmicos na cunicultura não é permitido, além de ser tóxico para coelhos (ANSES-ANMV, 2015; Lim *et al.*, 2008). As duas linhagens foram isoladas de amostras de carne diferentes (uma semana de diferença entre as amostras), originadas do mesmo produtor. Esse fato levanta uma antiga, porém frequente e atual, questão: essas linhagens teriam chegado à produção de coelhos pelo contato dos animais com seres humanos durante a produção, ou teriam sido selecionadas no ambiente da produção carregando os genes de resistência a ESC? Ou, ainda, as carnes de coelho teriam sido contaminadas durante o manuseio dos cortes? A falta de dados epidemiológicos mais concretos dificulta a obtenção de respostas a essas considerações de maneira cientificamente adequada no presente estudo.

O resultado de tipagem molecular por REP-PCR das linhagens isoladas no Brasil confirmam a utilidade da técnica para a seleção prévia de linhagens geneticamente distintas quando são selecionadas diversas colônias em ágar a partir de uma mesma amostra. Por outro lado, demonstra também que uma mesma amostra pode conter mais de uma linhagem diferente de *E. coli* resistente a ESC. A tipagem por restrição genômica com *Xba*I seguida de PFGE realizada com as linhagens isoladas de carnes de frango na França também mostrou a presença de diferentes linhagens em uma mesma amostra de carne. Em estudos de vigilância, que analisam grande quantidade de amostras e de linhagens bacterianas, faz-se de grande utilidade a tipagem por restrição do DNA genômico também como metodologia de triagem, tendo em vista a seleção de um representante de cada clone para a caracterização fenotípica e genotípica.

Em relação às cinco linhagens de *E. coli* isoladas na França, que formaram um *cluster* com 94,5% de similaridade (P6A1, P21B4, P36B1, P44B1 e P45B2) (**Figura 6**), essas foram isoladas a partir de cinco diferentes amostras de carnes de dois produtores. Todas pertencem ao mesmo grupo filogenético D2 e carregam *bla*_{CTX-M-1} em um plasmídeo IncII de 110 kb (**Quadro 2 – p. 71**), reforçando a similaridade entre as linhagens. A linhagem P44B1, tipada por MLST, foi identificada como parte do clone ST1640, já isolado de carnes e TGI de frangos na Suécia e na Alemanha (Börjesson, Bengtsson, *et al.*, 2013; Börjesson, Egervärn, *et al.*, 2013; Hansen *et al.*, 2016). É interessante observar que as linhagens isoladas na Suécia também carregavam *bla*_{CTX-M-1} em plasmídeos IncII. Ainda mais notável é o fato de que linhagens de *E. coli* ST1640 foram isoladas a partir de águas residuais hospitalares e de pacientes internados na França (Bréchet *et al.*, 2014), na mesma região onde estão localizados os dois produtores de frango

cujas linhagens isoladas das carnes formaram o referido *cluster*. No estudo de Bréchet e colaboradores, os autores não especificam o conteúdo de genes de resistência nas linhagens ST1640 isoladas. Além disso, devido à falta de informação adicional sobre as amostras de carnes de frango do presente estudo, e mesmo sobre a origem da água utilizada ou próxima às granjas no estudo de Bréchet e colaboradores, é difícil argumentar sobre uma origem comum para a contaminação com o clone de *E. coli* ST1640 carreador de IncI1-*bla*_{CTX-M-1}.

6.2 TSA nas linhagens de *E. coli* resistentes a ESC

De acordo com o resultado do teste fenotípico da produção de ESBL, foi possível determinar que a produção dessas enzimas foi o principal mecanismo de resistência a ESC nas *E. coli* isoladas de carnes de frango, independente do país de origem, e de coelho, bem como nas linhagens da maioria dos frangos (animais das Fazendas 1 e 2) (**Quadro 1 – p. 71**). Nas linhagens da Fazenda 3, que apresentaram resultado negativo no teste fenotípico para a produção de ESBL, a resistência às ESC resulta da produção de β -lactamases CMY-2 (**Quadro 1 – p. 71**). O mesmo foi observado nas três linhagens isoladas de carnes de frango da França que apresentaram *bla*_{CMY-2} (**Quadro 2 – p. 73**). Essas linhagens apresentaram perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos típico da produção de enzimas da família AmpC, ou seja, resistência a cefalosporinas de até terceira geração, à cefoxitina, ao aztreonam, e ao inibidor de β -lactamase ácido clavulânico (Bush, 2001).

Os resultados de TSA também mostram que as cinco amostras de carne de frango do Brasil, bem como a maioria das carnes de frango da França e as duas carnes de coelho, estavam contaminadas com *E. coli* resistentes não somente às ESC, mas também a outras classes de antimicrobianos (**Apêndices B, C e D**). Essa característica também foi observada nas *E. coli* isoladas nas fazendas onde foram amostrados *swabs* de cloaca, salvo nos animais da Fazenda 3, onde somente uma linhagem de *E. coli* (F160Bx) apresentou resistência também à estreptomicina e à canamicina, à tetraciclina e às sulfonamidas (**Apêndice B**). Em relação às carnes da França, somente a amostra P14 apresentou uma linhagem de *E. coli* (P14A1) resistente apenas a ESC (**Apêndice C**). As amostras de carne P31e P47 também apresentaram uma linhagem de *E. coli* com essa característica (P31A1 e P47A1), além de outras linhagens resistentes a outras classes de antimicrobianos (**Apêndice C**). Dessa forma, diversas linhagens do presente estudo foram caracterizadas como bactérias multirresistentes, ou seja, resistentes a pelo menos um representante de três ou mais classes de antimicrobianos (Magiorakos *et al.*, 2012) (**Apêndices B e C**).

A diferença na porcentagem de linhagens de *E. coli* que apresentaram resistência aos antimicrobianos não β -lactâmicos isoladas de carnes e do TGI de frangos no Brasil (**Tabela 1 – p. 68**) sugere que as linhagens provenientes das carnes podem não ter sua origem nos animais, ou, ao menos, que poucas linhagens presentes no TGI de frangos permanecem no produto final (carnes) após o processamento das carcaças. Assim, é plausível considerar a contaminação de carnes com linhagens resistentes como resultado da manipulação humana nos pontos de venda.

A comparação da porcentagem de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos não β -lactâmicos isoladas do TGI de frangos indica que há diferenças no manuseio e produção em cada fazenda. Como comunicado pelo veterinário responsável pela Fazenda 3, o tratamento preventivo com fluoroquinolonas (como a enrofloxacin) foi banido na empresa, e ESC (como o ceftiofur) são administradas somente para o tratamento de colibacilose em animais doentes. Por outro lado, os responsáveis pelas Fazendas 1 e 2 afirmaram que fluoroquinolonas são administradas para tratamento preventivo, junto à alimentação ou à água dos animais. Esse fato poderia explicar a diferença na porcentagem de linhagens que apresentaram resistência às quinolonas, porém não explica a maior porcentagem referente aos aminoglicosídeos, às sulfonamidas e à tetraciclina nas linhagens das Fazendas 1 e 2 (**Tabela 1 – p. 68**). Nesse caso, a resistência a outros antimicrobianos pode ser explicada pela localização dos genes *bla*_{CTX-M-2} (presente na maioria das linhagens isoladas no Brasil) em integrons de classe 1 complexos (**Quadro 1 – p. 71**), que sempre carregam o gene de resistência a sulfonamidas (*sulI*), e genes de resistência a aminoglicosídeos e/ou ao trimetoprim (*aadA* e *aadB*, e *dfrA*, respectivamente) estão presentes na região variável desses integrons (**Quadro 1 – p. 71**). De fato, é possível observar uma ampla correspondência entre os perfis fenotípico (**Apêndice B**) e genotípico (**Quadro 1 – p. 71**) de resistência nas linhagens carreadoras de *bla*_{CTX-M-2}. A literatura relata a resistência cruzada como um dos fatores responsáveis pela resistência às cefalosporinas em Enterobacteriaceae (Friedland *et al.*, 2003; Schumacher, Scheibel e Moller, 2000).

Genes de resistência à tetraciclina são amplamente disseminados na cadeia produtora de frangos (Kaesbohrer *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012), e no presente estudo a taxa de resistência à tetraciclina foi bastante elevada, considerando tanto as linhagens provenientes de carnes e animais do Brasil quanto as linhagens provenientes de carnes da França (**Tabela 1 – p. 68**). Porém, outra provável explicação para a resistência mesmo quando não são utilizados agentes antimicrobianos na produção de frangos pode ser a ocorrência de transmissão vertical (*top-down*) dos fatores de resistência a partir das aves parentais importadas (Börjesson, Bengtsson, *et al.*, 2013; Bortolaia, Bisgaard e Bojesen, 2010; Persoons *et al.*, 2011).

A comparação das porcentagens de linhagens que apresentaram resistência aos antimicrobianos não β -lactâmicos isoladas de carnes de frango do Brasil e da França (**Tabela 1 – p. 68**) sugere que práticas relacionadas ao manejo de animais, ou mesmo práticas relacionadas à saúde humana, em cada país, têm maior influência na seleção de bactérias resistentes no produto final vendido (no caso, as carnes) do que a disseminação de clones específicos no mundo pelo movimento de humanos e animais. Os resultados do presente estudo indicam a ocorrência de uma diversidade de linhagens em diferentes regiões geográficas, mesmo tratando-se o mesmo tipo de amostra (carnes de frango vendidas no varejo).

No Brasil, é permitida a comercialização, para uso veterinário, de antimicrobianos de todas as classes testadas no presente estudo (Brasil, 2014). Porém, as análises realizadas pelo governo brasileiro no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal), instituído pela Instrução Normativa SDA N.º 42, de 20 de dezembro de 1999, mostraram que apenas 0,8% das amostras de músculo de aves de corte continham oxitetraciclina ou enrofloxacina ou cloranfenicol acima dos valores de referência (Brasil, 2015). Na França, dentre os antimicrobianos autorizados para uso em aves (colistina, ampicilina, sulfonamidas, trimetoprim, quinolonas, tetraciclina), não estão incluídos os aminoglicosídeos e os fenicóis (ANSES, 2016), provável motivo pelo qual foi observada menor porcentagem de linhagens resistentes a antimicrobianos destas classes (**Tabela 1 – p. 68**). Porém, não explica o fato de nenhuma linhagem ter apresentado resistência à colistina, antimicrobiano utilizado em aves de produção (ANSES, 2016).

Em relação às duas linhagens isoladas de carnes de coelho da França, o resultado de resistência às demais classes de antimicrobianos que não β -lactâmicos é de difícil discussão devido à falta de dados. Porém, podemos considerar a possibilidade de que as carnes tenham sido contaminadas durante o manuseio. O perfil de suscetibilidade de L7B1 (**Apêndice D**) mostra que não haveria como selecionar esta linhagem no animal, uma vez que ela não apresenta resistência a nenhum outro antimicrobiano além dos β -lactâmicos e de fluoroquinolona, cujo uso na produção de coelhos na França não é permitido (ANSES, 2016). Assim, mais uma vez, os resultados sugerem que há contaminação por humanos durante a manipulação das carnes.

6.3 Identificação dos genes *bla* nas linhagens de *E. coli* resistentes a ESC

Observando a distribuição dos genes identificados nas linhagens isoladas de carnes de frango do Brasil e da França, fica evidente a predominância de *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-1},

respectivamente, em cada país (**Quadro 1 – p. 71 e Quadro 2 – p. 73**). A contaminação dessas carnes com *E. coli* carreadoras de outros genes de resistência a ESC (*bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-52}, *bla*_{SHV-12} e *bla*_{CMY-2}) parece ser pontual (**Quadro 1 – p. 71 e Quadro 2 – p. 73**).

Quanto aos genes identificados nas linhagens isoladas do TGI de frangos do Brasil, parece haver um padrão ou característica específicos de distribuição em cada ambiente ou granja (**Quadro 1 – p. 71**). O gene *bla*_{CTX-M-2} foi o único detectado na Fazenda 1, excetuando a linhagem F13Bx, cujo gene responsável pela produção de ESBL não foi identificado. Já *bla*_{CTX-M-55} foi detectado apenas na Fazenda 2, e em distribuição, praticamente, igualitária aos *bla*_{CTX-M-2}, sendo que sete linhagens apresentaram *bla*_{CTX-M-55} e seis, *bla*_{CTX-M-2}. Por fim, na Fazenda 3, não foi identificado nenhum gene *bla*_{CTX-M}, mas *bla*_{CMY-2} foi o único detectado, e exclusivamente, nesta propriedade (**Quadro 1 – p. 71**).

Desde a emergência de genes de ESBL em animais na França (Meunier *et al.*, 2006), o gene *bla*_{CTX-M-1} foi descrito como predominante em *E. coli* isoladas de animais (Dahmen, Haenni e Madec, 2012; Girlich *et al.*, 2007; Haenni *et al.*, 2014; Madec *et al.*, 2008) e de outras fontes, como linhagens clínicas e ambientais (Birgy *et al.*, 2012; Bréchet *et al.*, 2014; Dupouy *et al.*, 2016; Madec *et al.*, 2015; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2013), no país. Os resultados do presente estudo são consistentes com os de outros países da União Européia (Abgottspon *et al.*, 2014; Belmar Campos *et al.*, 2014; Cohen Stuart *et al.*, 2012; EFSA, 2011; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Overdevest *et al.*, 2011; Vogt *et al.*, 2014; Zarfel *et al.*, 2014). De acordo com o relatório do *European Food Safety Authority* (EFSA), a enzima CTX-M-1 parece estar disseminada em animais de produção e alimentos na maioria dos países europeus (EFSA, 2011). A presença de Enterobacteriaceae produtora de CTX-M-1 em aves de corte na França (Garcia-Fernandez *et al.*, 2008; Girlich *et al.*, 2007) e em carnes de frango importadas da França para a Dinamarca (Agersø *et al.*, 2012; Bergenholtz *et al.*, 2009) já foi previamente relatada, e, no presente estudo, foram detectadas *E. coli* carreadoras de *bla*_{CTX-M-1} isoladas de carnes de frango produzidas e vendidas na França.

No Brasil, o gene *bla*_{CTX-M-2} foi, historicamente, apresentado como predominante nas Enterobacteriaceae isoladas a partir de amostras clínicas humanas em hospitais (Andrade *et al.*, 2010; Bonnet *et al.*, 2000; Carmo Filho, Do *et al.*, 2008; Chagas *et al.*, 2011; Climaco, Minarini e Darini, 2010; Dropa *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2010; Minarini *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2015, 2014; Oliveira Garcia, de *et al.*, 2008; Queiroz *et al.*, 2012; Tollentino *et al.*, 2011). Além disso, estudos com Enterobacteriaceae isoladas a partir de carnes ou de animais de produção no país relatam a detecção de *bla*_{CTX-M-2} e/ou *bla*_{CTX-M-8} como predominantes, em relação aos *bla*_{CTX-M}-grupo 1 ou -grupo 9 (Aizawa *et al.*, 2014; Botelho *et*

al., 2015; Casella *et al.*, 2015; Dhanji *et al.*, 2010; Egervärn *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2014b, 2016; Koga *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2013; Warren *et al.*, 2008). Os resultados do presente trabalho concordam com os demais estudos no país, apresentando *bla*_{CTX-M-2} como o gene de resistência a ESC predominante entre as linhagens tanto de carne quanto do TGI de frangos.

Considerando apenas os genes *bla*_{CTX-M-grupo 1} identificados nas linhagens do Brasil, *bla*_{CTX-M-15} foi o único identificado em *E. coli* isoladas de carnes do varejo, e *bla*_{CTX-M-55} o único em *E. coli* do TGI de frangos destinados ao corte criados em propriedades da região de São José do Rio Preto – SP (**Quadro 1 – p. 71**). Em todo o mundo, mas, principalmente, em países europeus, o gene *bla*_{CTX-M-15} é descrito como prevalente dentre os genes *bla*_{CTX-M} em Enterobacteriaceae isoladas a partir de amostras clínicas (Belmar Campos *et al.*, 2014; Cantón *et al.*, 2008; Eckert *et al.*, 2004; Gibold *et al.*, 2014; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2007; Maciuca *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2014). Em estudos com bactérias isoladas de carnes e de animais e seus ambientes, tanto selvagens quanto domesticados ou para a produção de alimentos, os genes *bla*_{CTX-M-grupo 1} também aparecem como predominantes nestes mesmos países (Belmar Campos *et al.*, 2014; Clemente *et al.*, 2013; EFSA, 2011; Egervärn *et al.*, 2014; Haenni *et al.*, 2016; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Maciuca *et al.*, 2015; Meunier *et al.*, 2006; Randall *et al.*, 2011; Warren *et al.*, 2008). No Brasil, recentemente, o gene *bla*_{CTX-M-15} também passou a ser reportado em amostras clínicas (Berman *et al.*, 2014; Carvalho-Assef *et al.*, 2014; Cergole-Novella *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2016; Nogueira *et al.*, 2015; Peirano *et al.*, 2011; Seki *et al.*, 2013; Tollentino *et al.*, 2011), e, atualmente, já aparece como predominante ao lado de *bla*_{CTX-M-2} no país (Rocha, Pinto e Barbosa, 2016). É interessante observar que o aparecimento e o subsequente aumento gradual na frequência de detecção de *bla*_{CTX-M-15} também tem ocorrido em outros países onde *bla*_{CTX-M-2} era, anteriormente, considerado predominante, como Argentina, Israel e Japão (Hara *et al.*, 2015; Izdebski *et al.*, 2013; Karfunkel *et al.*, 2013; Livermore, 2012; Sennati *et al.*, 2012). O presente estudo descreve o isolamento de *E. coli* carreadoras de *bla*_{CTX-M-15} em uma amostra de carne de frango, concordando com a identificação de *bla*_{CTX-M-grupo 1} em outros estudos semelhantes no país (Botelho *et al.*, 2015; Koga *et al.*, 2015). Recentes estudos com Enterobacteriaceae isoladas a partir de carnes, de animais, de produção ou não, e de rios no Brasil relatam *bla*_{CTX-M-15} não relacionado apenas a amostras humanas (Botelho *et al.*, 2015; Dropa *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2016; Koga *et al.*, 2015; Leigue *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016), mostrando que o gene está, de fato, disseminando também por cenários além da clínica no país.

Diversos estudos sugerem a razão para a fácil disseminação do gene *bla*_{CTX-M-15}. Geralmente, esse gene está associado à *ISEcp1* e a plasmídeos conjugativos, especialmente do grupo IncF, bem como a clones bacterianos bem sucedidos, como *E. coli* ST131 (Carattoli, 2009; D'Andrea *et al.*, 2013; Zhao e Hu, 2013). A *ISEcp1* apresenta uma grande capacidade de disseminação, principalmente por interagir muito bem com plasmídeos conjugativos, que, por sua vez, interagem muito bem com clones bem sucedidos. Assim, *ISEcp1* comumente carrega *bla*_{CTX-M-15} (Cantón, González-Alba e Galán, 2012; Carattoli, 2009; Zhao e Hu, 2013) e, conseqüentemente, esse gene dissemina-se facilmente pelo mundo. De fato, Cantón e colaboradores (2012) já haviam sugerido que, a partir do momento em que CTX-M-15 entra em um território onde outras ESBL estão presentes, o aumento da ocorrência desta enzima, em detrimento às demais, ocorre em um lento processo devido ao ambiente genético de *bla*_{CTX-M-15} (Cantón, González-Alba e Galán, 2012).

O gene *bla*_{CTX-M-8} foi identificado pela primeira vez no Brasil em linhagens clínicas de Enterobacteriaceae (Bonnet *et al.*, 2000). Atualmente, continua sendo detectado (Aizawa *et al.*, 2014; Botelho *et al.*, 2015; Bueno *et al.*, 2016; Casella *et al.*, 2015; Dhanji *et al.*, 2010; Dropa *et al.*, 2016; Egervärn *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2014a, 2016; Fitch *et al.*, 2016; Minarini *et al.*, 2009; Zogg *et al.*, 2016) e são comuns no país, após CTX-M-2 e CTX-M-15 que são as variantes dominantes (Rocha, Pinto e Barbosa, 2016). Entretanto, no presente estudo detectou-se apenas uma linhagem de *E. coli* produtora de CTX-M-8, proveniente de carne de frango (**Quadro 1 – p. 71**). Outros estudos, realizados no Brasil e no exterior (Botelho *et al.*, 2015; Casella *et al.*, 2015; Dhanji *et al.*, 2010; Egervärn *et al.*, 2014; Koga *et al.*, 2015) também descreveram a presença de *bla*_{CTX-M-8} em carnes de frango.

De acordo com a revisão da literatura, esse é o primeiro relato de *bla*_{CTX-M-55} em bactérias isoladas de animais de produção no Brasil. Foi sugerido que a transmissão desse gene para humanos se dá a partir dos animais, pois ele está amplamente distribuído entre *E. coli* isoladas de animais de companhia e de produção, apesar de sua abrangência se restringir, principalmente, à Ásia (Kameyama *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2010; Lv *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2012).

Assim como CTX-M-1, as enzimas TEM-52, SHV-12 e CMY-2 parecem ser prevalentes em *E. coli* isoladas de animais de produção e alimentos em países europeus (EFSA, 2011). A produção de enzimas TEM com características de ESBL é praticamente exclusiva entre linhagens de *E. coli* e *Salmonella* de aves e humanos (Haenni *et al.*, 2012) e, de acordo com o relatório do ESFA, TEM-52 é a enzima da família TEM mais detectada na Europa (EFSA, 2011). De fato, alguns estudos relatam a detecção dessa enzima em linhagens isoladas

de humanos na França (Biendo *et al.*, 2005; Cloeckaert *et al.*, 2007; Moissenet *et al.*, 2010; Weill *et al.*, 2006), e pouco se sabe sobre linhagens isoladas de aves de produção no país. De acordo com a literatura, este é o primeiro relato de genes *bla*_{TEM-52} em *E. coli* isoladas a partir de carnes de frango na França. Diversos estudos já relataram a presença de *bla*_{TEM-52} em aves de produção ou suas carnes em outros países europeus (Belmar Campos *et al.*, 2014; Cloeckaert *et al.*, 2007; Cohen Stuart *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2009; Dierikx *et al.*, 2013; Endimiani *et al.*, 2012; Geser, Stephan e Hächler, 2012; Kola *et al.*, 2012; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Overdevest *et al.*, 2011; Randall *et al.*, 2011; Smet *et al.*, 2008), mostrando uma provável tendência de disseminação desse gene pela cadeia produtora de frangos também na França.

A produção de SHV-12 e CMY-2 por linhagens de *E. coli* isoladas na cadeia produtora de aves na Europa já é bem documentada na literatura (Accogli *et al.*, 2013; Agersø *et al.*, 2012; Belmar Campos *et al.*, 2014; Dierikx *et al.*, 2013; Dolejska *et al.*, 2011; Egea *et al.*, 2012; Egervärn *et al.*, 2014; Hansen *et al.*, 2016; Jones-Dias *et al.*, 2016; Kola *et al.*, 2012; Vogt *et al.*, 2014; Zarfel *et al.*, 2014), mas pouco é sabido sobre a França (Agersø *et al.*, 2012). Os resultados do presente estudo confirmam, também, a primeira descrição de genes *bla*_{SHV-12} e *bla*_{CMY-2} em *E. coli* isoladas de carnes de frango vendidas na França, mostrando que estudos adicionais são importantes para entender a disseminação desses genes pela cadeia produtiva de frangos naquele país. Apesar de terem sido detectadas poucas linhagens de *E. coli* carreadoras de *bla*_{TEM-52}, *bla*_{SHV-12} e *bla*_{CMY-2}, o estudo mostra a presença desses genes em carnes de frango vendidas na França, a partir das quais podem ser transmitidos à população humana via consumo ou manuseio dos alimentos (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Vincent *et al.*, 2010).

A comparação dos resultados de genes de resistência a ESC obtidos nas linhagens isoladas de carnes de frango do Brasil e da França, associados ao conhecimento registrado na literatura, sugerem duas proposições. A primeira é que os genes *bla* carreados por linhagens bacterianas contaminando as carnes não são, de forma geral, os mesmos carreados por linhagens causadoras de infecções em humanos; a segunda proposição é que as linhagens contaminantes de carnes de frango carregam genes *bla* diferentes de acordo com a localização geográfica, no caso, países distantes entre si.

Quanto à primeira proposição, desde os primeiros relatos das enzimas CTX-M em linhagens clínicas na França, a variante CTX-M-15 tem sido descrita, especialmente concomitante a CTX-M-1 e CTX-M-14, e, atualmente, sua frequência de detecção tem aumentado (Birgy *et al.*, 2012; Blanc *et al.*, 2014; Bonnet, 2004; Brasme *et al.*, 2007; Carrër *et al.*, 2009; Carrër e Nordmann, 2011; Dortet, Poirel e Nordmann, 2014; Dupont *et al.*, 2016; Eckert *et al.*, 2004; Eckert, Gautier e Arlet, 2006; Gibold *et al.*, 2014; Izdebski *et al.*, 2013;

Janvier *et al.*, 2014; Lartigue, Fortineau e Nordmann, 2005; Livermore *et al.*, 2007; Marcadé *et al.*, 2009; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2012, 2013; Nicolas-Chanoine e Jarlier, 2008; Ruppé *et al.*, 2012). No presente estudo, foi detectada somente a variante CTX-M-1, historicamente associada a aves de produção na França (Cloeckaert *et al.*, 2010; Girlich *et al.*, 2007; Meunier *et al.*, 2006). Fato semelhante é observado no Brasil, onde, atualmente, as variantes CTX-M-2 e CTX-M-15 são detectadas em frequências semelhantes no âmbito clínico (Rocha, Pinto e Barbosa, 2016), e em frangos e carnes de frango, a principal variante detectada é CTX-M-2, com raros casos de outras variantes (Botelho *et al.*, 2015; Casella *et al.*, 2015; Dhanji *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2016; Koga *et al.*, 2015). No presente estudo, CTX-M-2 também foi a principal variante identificada. Esses dados, em conjunto, evidenciam que os genes *bla*_{CTX-M} detectados em Enterobacteriaceae causadoras de infecções em humanos e as presentes em frangos e carnes de frango no Brasil e na França não são os mesmos, ou não estão distribuídos nas mesmas proporções, mostrando que pode não haver uma relação direta entre ambos os tipos de linhagens; ou, então, que essa relação é tênue e os resultados são observados a longo prazo, pois, normalmente, as mudanças na prevalência de detecção das variantes de *bla*_{CTX-M} são, primeiramente, observadas em linhagens clínicas humanas e, após algum tempo, em linhagens isoladas de animais e/ou seus produtos e ambientes. A discussão acima também corrobora a segunda proposição sugerida pela análise dos dados, mostrando as diferenças de detecção das variantes de *bla*_{CTX-M} em cada país.

O gene *bla*_{SHV-12} é extremamente raro na França, e nunca havia sido detectado em linhagens isoladas a partir de carnes de coelho. No presente estudo, uma baixa detecção foi observada, tanto em linhagens provenientes de carnes de frango quanto de carnes de coelho (**Quadro 2 – p. 73**), e existem poucos relatos desse gene carregado por bactérias isoladas de amostras de carnes em todo o mundo (Pacholewicz *et al.*, 2015; Pehlivanlar Önen *et al.*, 2015). Poucos estudos relatam a presença de *bla*_{SHV-12} em *E. coli* isoladas a partir da cadeia produtora animal, sendo, porém, geralmente encontrado em bactérias isoladas de frangos (Accogli *et al.*, 2013; Clemente *et al.*, 2015; Hoek, van *et al.*, 2016; Jones-Dias *et al.*, 2016; Solà-Ginés *et al.*, 2015). Alguns estudos investigaram a presença de genes de ESBL em *E. coli* isoladas de coelhos, porém nenhum detectou *bla*_{SHV-12} (Jones-Dias *et al.*, 2016; Poeta *et al.*, 2010; Sallem, Ben *et al.*, 2012). Até mesmo em outros dois estudos que detectaram genes de ESBL e pAmpC em *E. coli* isoladas em fazendas de criação de coelhos, o gene *bla*_{SHV-12} não foi mencionado (Blanc *et al.*, 2006; Mesa *et al.*, 2006). Assim, de acordo com a literatura, este estudo também parece ser o primeiro a descrever a presença de *bla*_{SHV-12} em *E. coli* isoladas a partir de carnes de coelhos no mundo.

6.4 Caracterização do contexto genético dos genes *bla*

6.4.1 Contexto genético de *bla*_{CTX-M-2}

Com relação aos genes *bla*_{CTX-M-2} detectados nas linhagens de *E. coli* isoladas de frangos e carnes de frango do Brasil, os mesmos encontram-se *downstream* à *ISCR1*, inseridos em integrons de classe 1 complexos, cujos cassetes gênicos da região variável foram *aadA*, *drfA*, *dfrA+aadA* ou *aadB+aadA* (**Quadro 1 – p. 71**). *ISCR1* é a sequência de inserção mais comumente associada a *bla*_{CTX-M-2} na literatura, geralmente inseridas em integrons de classe 1 (Arduino *et al.*, 2002; Cantón, González-Alba e Galán, 2012; Casella *et al.*, 2015; Conza, Di *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2014b, 2016; Poirel, Bonnin e Nordmann, 2012; Power *et al.*, 2005).

Exceto a linhagem CFCTX57, que conjugou o plasmídeo carreador de *bla*_{CTX-M-2} (**Quadro 1 – p. 71**), as demais linhagens parecem apresentar o gene inserido no cromossomo, fato já documentado em linhagens isoladas de frangos analisados no noroeste do Estado de São Paulo (Ferreira *et al.*, 2014b). Quanto à linhagem CFCTX57, o gene *bla*_{CTX-M-2} é carreado por um plasmídeo multireplicon IncHI2/P de 242,5 kb. Poucos estudos descrevem *bla*_{CTX-M-2} carreados por plasmídeos multireplicons IncHI2/P em *E. coli* e *Salmonella* derivadas de aves de corte ou carnes (Dierikx *et al.*, 2010; Doublet *et al.*, 2014; Egervärn *et al.*, 2014).

6.4.2 Contexto genético de *bla*_{CTX-M-8}

A linhagem de carne CFCTX23 apresentou *bla*_{CTX-M-8} *downstream* à *IS10*, carreado por um plasmídeo IncII de 100 kb (**Quadro 1 – p. 71**). Em um estudo realizado com amostras de carne de frango importadas do Brasil para a Suécia, os genes *bla*_{CTX-M-8} detectados também eram carreados por plasmídeos IncII (Egervärn *et al.*, 2014). Além disso, *E. coli* carreadoras de *IS10-bla*_{CTX-M-8} em plasmídeos IncII, porém de 50 e 60 kb, foram isoladas de cloacas de frangos no Brasil (Ferreira *et al.*, 2014a, 2016). Também, como no presente estudo (**Apêndice E**), já foi demonstrado que plasmídeos IncII carregam poucos ou nenhum gene de resistência adicional aos genes de ESBL (Hopkins *et al.*, 2006; Kirchner *et al.*, 2011). A presença de *IS10 upstream* a *bla*_{CTX-M-8} é comum, e tem sido relatada desde a primeira detecção do gene (Bonnet *et al.*, 2000; Dhanji *et al.*, 2010).

6.4.3 Contexto genético de *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-55}

O plasmídeo IncX1 (55 kb) portando o gene *bla*_{CTX-M-15} *downstream* à *ISEcp1*, na linhagem de carne CFCTX36 (**Quadro 1 – p. 71**), parece ser de ocorrência bastante rara. Apenas uma vez na literatura, um plasmídeo do grupo de incompatibilidade IncX portando *bla*_{CTX-M-15} foi relatado, em um caso de septicemia por *E. coli* ST131 (Partridge *et al.*, 2011). Este plasmídeo raramente carrega outros genes de resistência além do gene de ESBL (Partridge *et al.*, 2011), o que corrobora o fato de a transconjugante CFCTX36^{TC} não apresentar resistência a outras classes de antimicrobianos (**Apêndice E**). O gene *bla*_{CTX-M-15} também já foi detectado a partir de frango no Brasil, em um plasmídeo de 50 kb pertencente a um grupo de incompatibilidade não tipável pelo esquema tradicional PBRT (Ferreira *et al.*, 2016).

Plasmídeos IncF portando *bla*_{CTX-M-grupo 1} são comumente descritos na literatura (Carattoli, 2011, 2013; Carattoli *et al.*, 2008), como o *bla*_{CTX-M-55}-IncFII (90 kb) identificado na linhagem F66Bx do presente estudo (**Quadro 1 – p. 71**). Porém, plasmídeos multireplicons IncN/FII (100-110 kb), como os detectados nas linhagens isoladas de TGI de frangos carreadoras de *bla*_{CTX-M-55} (**Quadro 1 – p. 71**), foram descritos apenas uma vez, em um estudo com frangos na China que também identificou plasmídeos IncN/F carregando *bla*_{CTX-M-55} (Yang *et al.*, 2014). Outro caso desse tipo de plasmídeo multirreplicon, porém carregando *bla*_{CTX-M-1}, foi relatado em uma *E. coli* isolada de fezes de porcos na Suíça (Geser, Stephan e Hächler, 2012; Zurfluh, Wang, *et al.*, 2014). Outros *bla*_{CTX-M-55} descritos na literatura são carreados por plasmídeos dos grupos de incompatibilidade N, F, F/I1, I1, I2, e plasmídeos não tipáveis, além de, sempre, estarem localizados *downstream* à *ISEcp1* (Lv *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2012), como no presente estudo.

Quase todos os *bla*_{CTX-M-1} (95,6%) das linhagens isoladas de carnes de frango da França no presente estudo são carreados por plasmídeos IncI1 (97-120 kb, 195 kb); os outros três *bla*_{CTX-M-1} são carreados por plasmídeos IncFII (120-150 kb). Plasmídeos *bla*_{ESBL}-IncI1 são comuns na França (Dahmen *et al.*, 2013; Dahmen, Haenni e Madec, 2012; Dupouy *et al.*, 2016; Haenni *et al.*, 2012, 2014, Madec *et al.*, 2011, 2012; Marcadé *et al.*, 2009), mas seu relato em aves de corte no país é raro (Cloeckaert *et al.*, 2010; Garcia-Fernandez *et al.*, 2008; Girlich *et al.*, 2007).

À exceção de três plasmídeos *bla*_{CTX-M-1}-IncI1 (plasmídeos das linhagens P16B3, P23B1 e P34A1) e os *bla*_{CTX-M-1}-IncFII (das linhagens P5A1, P9A1 e P36A1), todos os demais plasmídeos carreadores de *bla*_{CTX-M-1} testados conjugaram (**Quadro 2 – p. 73**). No presente estudo, plasmídeos do grupo de incompatibilidade I1 carregando *bla*_{CTX-M-1} foram os mais

detectados. Além disso, plasmídeos *bla*_{CTX-M-1}-IncII têm sido identificados tanto a partir de amostras clínicas humanas quanto de aves de corte em toda a Europa (Accogli *et al.*, 2013; Börjesson, Bengtsson, *et al.*, 2013; Börjesson, Egervärn, *et al.*, 2013; Cloeckaert *et al.*, 2010; Dierikx *et al.*, 2010, 2013; Doublet *et al.*, 2014; Egervärn *et al.*, 2014; Garcia-Fernandez *et al.*, 2008; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Madec *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2009; Zurfluh, Jakobi, *et al.*, 2014; Zurfluh, Wang, *et al.*, 2014). Os resultados do presente estudo concordam com um estudo com aves de corte previamente realizado na França há 10 anos (Girlich *et al.*, 2007), mostrando a persistência de plasmídeos *bla*_{CTX-M-1}-IncII na cadeia produtora de frangos.

6.4.4 Contexto genético de *bla*_{TEM-52}, *bla*_{SHV-12} e *bla*_{CMY-2}

Três *bla*_{TEM-52} são carregados por plasmídeos IncX1 (45 kb), e os outros dois, por plasmídeos IncII (100 kb). O gene *bla*_{SHV-12} também é carregado por um plasmídeo IncII (130 kb). Dois *bla*_{CMY-2} são carregados por plasmídeos IncA/C (165 kb), e o terceiro, por um plasmídeo IncK (90 kb).

À exceção dos dois *bla*_{CMY-2}-IncA/C, de linhagens de carnes de frango da França, e dos *bla*_{CMY-2} das linhagens isoladas do TGI de frangos do Brasil, todos os demais plasmídeos carregadores de *bla*_{ESBL/pAmpC} testados conjugaram (**Quadro 1 – p. 71 e Quadro 2 – p. 73**). No presente estudo, foram detectados plasmídeos do grupo de incompatibilidade II carregando os genes *bla*_{TEM-52} e *bla*_{SHV-12}. Esses plasmídeos já foram detectados em linhagens isoladas a partir de humanos e de aves de produção na Europa, e também na França (Accogli *et al.*, 2013; Bielak *et al.*, 2011; Bortolaia *et al.*, 2010; Cloeckaert *et al.*, 2007; Dierikx *et al.*, 2010; Figueiredo *et al.*, 2015; Garcia-Fernandez *et al.*, 2008; Haenni *et al.*, 2012; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Marcadé *et al.*, 2009; Moissenet *et al.*, 2010; Smet *et al.*, 2009). Esse fato pode significar uma disseminação desses plasmídeos pela Europa.

Apesar de plasmídeos IncX1 carregadores de *bla*_{TEM-52} serem raros em linhagens isoladas de humanos e aves de produção na Europa (Bergenholtz *et al.*, 2009; Bielak *et al.*, 2011; Huijbers *et al.*, 2014; Nüesch-Inderbinen e Stephan, 2016), no presente estudo foram encontrados com maior frequência (60,0%) que plasmídeos IncII-*bla*_{TEM-52} (**Quadro 2 – p. 73**). Entretanto, é importante notar que as três linhagens de *E. coli* portadoras de IncX1-*bla*_{TEM-52} (P26A1, P31A1 e P31B2) foram isoladas de duas diferentes amostras de carne provenientes do mesmo fornecedor D (**Quadro 2 – p. 73 e Apêndice C**). O mesmo é observado quanto aos *bla*_{TEM-52} carregados por plasmídeos IncII, cujas linhagens de *E. coli* (P1A1e P47A1) foram isoladas de duas diferentes amostras de carne provenientes do mesmo fornecedor A (**Quadro**

2 – p. 73 e Apêndice C). Esse fato sugere que um plasmídeo IncI1 e um IncX1 podem estar presentes em alguma parte do sistema de produção (engorda ou abate dos animais, ou partição das carcaças) dos fornecedores A e D, respectivamente.

O gene *bla_{CMY-2}* carregado por plasmídeos IncA/C ou IncK já foi relatado em países europeus em linhagens bacterianas isoladas tanto a partir de humanos quanto de aves de produção, incluindo carnes de frango importadas da França pela Dinamarca (Bergenholtz *et al.*, 2009; Börjesson, Egervärn, *et al.*, 2013; Carattoli, 2009; Dierikx *et al.*, 2010; Egervärn *et al.*, 2014; Hansen *et al.*, 2016; Huijbers *et al.*, 2014; Naseer *et al.*, 2010; Verdet *et al.*, 2009). Além disso, foi sugerido que plasmídeos IncA/C são amplamente disseminados entre linhagens associadas a animais de produção (Carattoli, 2011). Considerando, portanto, que plasmídeos IncA/C são globalmente relacionados à transmissão de *bla_{CMY-2}*, mas que, também, a presença de plasmídeos IncK está aumentando em aves de produção (Börjesson, Egervärn, *et al.*, 2013), os resultados do presente estudo concordam com o encontrado na literatura, apesar da baixa frequência de detecção desse gene.

Não foi possível determinar o grupo de incompatibilidade dos plasmídeos carregadores de *bla_{CMY-2}* nas linhagens de *E. coli* provenientes da Fazenda 3, no Brasil. Porém, todos os oito genes detectados são carregados por um plasmídeo de 90 kb (**Quadro 1 – p. 71**). Plasmídeos *bla_{CMY-2}*-IncI1 de 90 kb já foram detectados em perus e carnes de frango na Alemanha (Rodríguez *et al.*, 2009). Podemos sugerir a possibilidade de *bla_{CMY-2}* ser disseminado por um único plasmídeo na Fazenda 3, mas os resultados obtidos até o momento não permitem uma conclusão sensata. Além disso, todos os oito *bla_{CMY-2}* estão localizados *downstream* à *ISEcp1*. A mobilização de *bla_{CMY-2}* do cromossomo de *Citrobacter freundii* por essa IS foi anteriormente sugerida (Giles *et al.*, 2004; Kang, Besser e Call, 2006). Este contexto genético de genes *bla_{CMY}* já foi identificado em diversos outros estudos (D'Andrea *et al.*, 2006; Naseer *et al.*, 2010; Verdet *et al.*, 2009). No Brasil, apesar de *bla_{CMY-2}* já ter sido identificado, nenhum dos estudos determinaram a presença de *ISEcp1 upstream* ao gene (Aizawa *et al.*, 2014; Campana *et al.*, 2013; Mattiello *et al.*, 2015; Pavez *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2016).

A presença de dois diferentes plasmídeos conjugativos, IncI1 (120 kb) e Inc não tipável (50 kb), carregando *bla_{SHV-12}* nas linhagens isoladas de carnes de coelho da França, aliado ao fato de que esse gene é raro no país, sugere que alguma fonte não-humana e não-animal deve ser a responsável pela contaminação dessas carnes (ver discussão no final da seção 6.3).

A presença de bactérias carreadoras de plasmídeos conjugativos portadores de genes de ESBL em carnes destinadas ao consumo é preocupante. Após a ingestão, essas bactérias podem chegar ao intestino e transferir o plasmídeo para outras bactérias da microbiota intestinal normal (Capozzi e Spano, 2009; Schaik, 2015; Shterzer e Mizrahi, 2015).

A transferência horizontal de genes por processos de transformação de DNA parece não ser muito frequente no TGI de mamíferos, porém os processos de conjugação e transdução parecem contribuir bastante para a disseminação de genes de resistência entre linhagens da microbiota intestinal (Schaik, 2015). Uma vez estabilizados nesta população, os genes de resistência podem ser transferidos para outras bactérias da microbiota, inclusive entre diferentes espécies, ou mesmo, para algum patógeno oportunista – como diversos membros da família Enterobacteriaceae –, mesmo que este fato ocorra em taxas bastante baixas (Modi, Collins e Relman, 2014; Schaik, 2015; Stecher, Maier e Hardt, 2013). Essas taxas são baixas pelo fato de haver, geralmente, baixa densidade de bactérias patogênicas no intestino, se comparada à densidade populacional da microbiota normal neste sítio (Stecher *et al.*, 2012).

Exemplos de experimentos *in vivo* confirmam a ocorrência da transferência de genes de resistência entre a microbiota intestinal e outras bactérias, inclusive patogênicas (Göttig *et al.*, 2015; Sparo *et al.*, 2012; Stecher *et al.*, 2012). Além disso, outros estudos comprovam a ocorrência de transferência horizontal de genes de resistência em pacientes em tratamento com antimicrobianos (Goren *et al.*, 2010; Göttig *et al.*, 2015; Richter *et al.*, 2011).

Os ensaios de conjugação não resultaram em êxito, com a metodologia utilizada, para a maioria das linhagens isoladas de carnes e de cloacas de frango produtoras de CTX-M-2. Botelho e colaboradores (2015), estudando carnes de frango no Brasil, também não obtiveram êxito na conjugação *in vitro* de genes *bla*_{CTX-M-2}, e Ferreira e colaboradores (2014) detectaram linhagens de *E. coli* isoladas de cloacas de frango, também no país, carreando esses genes inseridos no cromossomo (Botelho *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2014b). Assim, estudos adicionais são necessários para comprovar se os *bla*_{CTX-M-2} detectados no presente estudo estão localizados em plasmídeos não conjugativos ou se, de fato, estão inseridos no cromossomo das linhagens de *E. coli* estudadas.

6.5 Classificação das linhagens de *E. coli* em grupos filogenéticos

Escherichia coli recuperadas a partir de frangos, seja de carnes, carcaças ou do TGI, variam bastante quanto ao grupo filogenético predominante, mesmo em um único país. Provavelmente, este fato seja devido às diferentes fontes de contaminação em cada ambiente.

Por exemplo, no Brasil, os estudos diferem de maneira considerável. Kobayashi e colaboradores descreveram a predominância do grupo A, mas não discriminam as taxas em carnes e carcaças de frango no Estado do Paraná (Kobayashi *et al.*, 2011). Koga e colaboradores relataram a predominância do grupo filogenético B1 em carcaças, também no Paraná (Koga *et al.*, 2015), e Botelho e colaboradores descreveram o grupo D como predominante em carnes de frango no Estado do Rio de Janeiro (Botelho *et al.*, 2015). Ferreira e colaboradores mostraram que o filogrupo A predomina em *E. coli* isoladas do TGI de frangos em duas fazendas no Estado de São Paulo (Ferreira *et al.*, 2014b, 2016). No estudo de Kobayashi, a taxa de detecção do filogrupo B2 (21,25%) foi maior que a de B1 (Kobayashi *et al.*, 2011), enquanto no estudo de Koga, apenas 4,1% das linhagens pertenciam ao grupo filogenético B2 (Koga *et al.*, 2015). O estudo de Koga e o de Kobayashi diferem, principalmente, pois no segundo, não foram estudadas apenas linhagens de *E. coli* produtoras de ESBL, como no primeiro. No estudo de Botelho e nos de Ferreira não foram detectadas linhagens do filogrupo B2 (Botelho *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2014b, 2016).

No presente estudo, o grupo filogenético D foi o mais prevalente nas linhagens de carnes e de TGI de frangos do Brasil (**Quadro 1 – p. 71**), concordando, apenas, com o estudo de Botelho e colaboradores, apesar de todos os estudos mencionados na comparação terem utilizado uma metodologia de identificação de grupo filogenético diferente da usada no presente estudo. Ainda, nas linhagens de *E. coli* isoladas a partir de carnes de frango da França, não houve diferença significativa na detecção dos filogramas D, A e B1 (**Quadro 2 – p. 73**).

O grupo filogenético D, por vezes considerado como virulento e causador de infecções extraintestinais (Clermont, Bonacorsi e Bingen, 2000; Dhanji *et al.*, 2010; Novais *et al.*, 2007), predominou dentre as linhagens de carnes de frango do Brasil (55,5%), como no estudo de Dhanji e colaboradores, que analisaram carnes de frango importadas para o Reino Unido de países da América do Sul, incluindo o Brasil (Dhanji *et al.*, 2010). O mesmo filogrupo D predominou também entre as 42 linhagens de TGI de frangos do Brasil avaliados neste estudo (57,1%), diferindo de outro estudo com linhagens isoladas do TGI de frangos no país (Ferreira *et al.*, 2014b, 2016), mas se assemelhando ao estudo de Maciuca e colaboradores, na Romênia, e ao estudo de Reich e colaboradores, na Alemanha (Maciuca *et al.*, 2015; Reich, Atanassova e Klein, 2013). Outros estudos apresentam o grupo filogenético A como predominante dentre linhagens isoladas a partir de carnes de aves, na Espanha (Egea *et al.*, 2012), ou, também, o filogrupo B1 predominando dentre as linhagens de carne de frango, na Itália (Ghodousi *et al.*, 2015). De maneira geral, a literatura aponta variações entre a prevalência dos grupos filogenéticos A, B1 e D em linhagens isoladas a partir do setor de produção de aves mas,

geralmente, o filogrupo B2 aparece em frequência bastante baixa (Botelho *et al.*, 2015; Egea *et al.*, 2012; Ghodousi *et al.*, 2015; Huijbers *et al.*, 2014; Kluytmans *et al.*, 2013; Koga *et al.*, 2015; Maciuca *et al.*, 2015; Reich, Atanassova e Klein, 2013).

Mais uma vez, aliando os dados de grupos filogenéticos aos de genes *bla* e plasmídeos, parece haver uma distinção nas linhagens de *E. coli* presente na superfície de carnes de frango e no TGI dos animais de acordo com cada ambiente, abatedouro, fazenda, animal, manipuladores, setor ou região geográfica.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- a) Carnes de frango comercializadas nos municípios analisados no Brasil e na França apresentam contaminação por linhagens de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de espectro estendido, além de resistentes a outras classes de antimicrobianos (aminoglicosídeos, fenicóis, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas e trimetoprim).
- b) Linhagens de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de espectro estendido e também a outras classes de antimicrobianos (aminoglicosídeos, fenicóis, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas e trimetoprim) colonizam o TGI de frangos criados em granjas localizadas no Estado de São Paulo.
- c) Os genes *bla*_{CTX-M} são os principais determinantes de resistência a ESC nas linhagens de *E. coli* isoladas de carne e do TGI de frangos. O gene *bla*_{CTX-M-2} predomina em linhagens isoladas de carnes e do TGI de frangos nas amostras do Brasil, e *bla*_{CTX-M-1} predomina em linhagens isoladas das amostras de carnes da França.
- d) Nas linhagens isoladas no Brasil, os genes *bla*_{CTX-M-2} estão associados à *ISCR1* e inseridos em integrons de classe 1 complexos. Os genes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-55} e *bla*_{CMY-2} estão associados à *ISEcp1*, e o gene *bla*_{CTX-M-8}, à *IS10*.
- e) Nas linhagens isoladas de carnes de frango no Brasil, um gene *bla*_{CTX-M-2} está localizado em um plasmídeo IncHI2/P (242,5 kb). O gene *bla*_{CTX-M-8} é carreado por um plasmídeo IncI1 (100 kb), e um *bla*_{CTX-M-15}, por um plasmídeo IncX1 (55 kb).
- f) Nas linhagens isoladas do TGI de frangos no Brasil, *bla*_{CTX-M-55} estão localizados em plasmídeos IncN/FII (100-110 kb) ou IncFII (90 kb), e *bla*_{CMY-2}, localizados em plasmídeos de 90 kb.
- g) Nas linhagens isoladas de carnes de frango na França, *bla*_{CTX-M-1} estão localizados em plasmídeos IncI1 (97-195 kb) ou IncFII (120-150 kb), *bla*_{TEM-52} a plasmídeos IncI1 (100 kb) ou IncX1 (45 kb), *bla*_{CMY-2} a plasmídeos IncA/C (165 kb) ou IncK (90 kb), e *bla*_{SHV-12} a um plasmídeo IncI1 (130 kb).

- h) Nas linhagens isoladas de carnes de coelho da França, um *bla*_{SHV-12} foi detectado carregado por um plasmídeo IncI1 (120 kb), e o outro *bla*_{SHV-12}, a um plasmídeo de Inc não tipável (50 kb).
- i) No Brasil, linhagens pertencentes aos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D estão presentes em carne e TGI de frangos, porém, predomina o filogrupo D.
- j) Na França, não há predominância significativa entre dos filogrupos D, A e B1, e linhagens do grupo filogenético B2 também estão presentes.
- k) *Escherichia coli* veiculadas pela cadeia de produção animal carregam genes codificadores de ESBL e pAmpC.
- l) Genes de resistência a ESC, os plasmídeos que os carregam, e mesmo as linhagens resistentes de *E. coli* parecem ser específicos para diferentes regiões geográficas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABGOTTSPON, H. *et al.* Characteristics of Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Swiss and Imported Poultry Meat. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 1, p. 112–115, 1 jan. 2014.

ABREU, R. *et al.* Prevalence of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* Strains Isolated in Poultry Farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 11, p. 868–73, 2014.

ACCOGLI, M. *et al.* IncII plasmids associated with the spread of CMY-2, CTX-M-1 and SHV-12 in *Escherichia coli* of animal and human origin. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 5, p. 2–4, 2013.

AGERSØ, Y. *et al.* Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 3, p. 582–588, 2012.

AIZAWA, J. *et al.* Identification of fluoroquinolone-resistant extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-8)-producing *Escherichia coli* ST224, ST2179 and ST2308 in buffalo (*Bubalus bubalis*). **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2866–2869, 2014.

AMBLER, R. P. The Structure of β -Lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 1980.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nat Rev Microbiol**, v. 12, n. 7, p. 465–478, 2014.

ANDRADE, L. N. *et al.* Determinants of beta-lactam resistance in meningitis-causing Enterobacteriaceae in Brazil. **Can J Microbiol**, v. 56, n. 5, p. 399–407, 2010.

ANSES. **Index des médicaments vétérinaires autorisés en France**. Disponível em: <<http://www.ircp.anmv.anses.fr/>>. Acesso em: 7 set. 2016.

ANSES-ANMV. **Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2014**. [s.l.: s.n.]. Disponible em: <<https://www.anses.fr/en/system/files/ANMV-Ra-Antibiotiques2014.pdf>>.

ANTUNES, P.; COQUE, T. M.; PEIXE, L. Emergence of an IncIgamma plasmid encoding CMY-2 β -lactamase associated with the international ST19 OXA-30-producing β -lactamase *Salmonella* Typhimurium multidrug-resistant clone. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 10, p. 2097–2100, 2010.

APUA. The Need to Improve Antimicrobial Use in Agriculture. Ecological and Human Health Consequences. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. s3, p. S71–S144, jun. 2002.

ARDUINO, S. M. *et al.* *bla*_{CTX-M-2} Is Located in an Unusual Class 1 Integron (In35) Which Includes Orf513. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 7, p. 2303–2306, 2002.

BARLOW, M. *et al.* High rate of mobilization for *bla*_{CTX-MS}. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 3, p. 423–8, mar. 2008.

BARTON, B. M.; HARDING, G. P.; ZUCCARELLI, A. J. A general method for detecting and sizing large plasmids. **Analytical biochemistry**, v. 226, n. 2, p. 235–40, 10 abr. 1995.

BAUERNFEIND, A.; GRIMM, H.; SCHWEIGHART, S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, v. 18, n. 5, p. 294–8, 1990.

BELMAR CAMPOS, C. *et al.* Prevalence and genotypes of extended spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from human stool and chicken meat in Hamburg, Germany. **Int J Med Microbiol**, v. 304, n. 5–6, p. 678–684, 2014.

BERGENHOLTZ, R. D. *et al.* Characterization of genetic determinants of extended-spectrum cephalosporinases (ESCs) in *Escherichia coli* isolates from Danish and imported poultry meat. **J Antimicrob Chemother**, v. 64, n. 1, p. 207–209, 2009.

BERGERON, C. R. *et al.* Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 3, p. 415–421, 2012.

BERMAN, H. *et al.* Distribution of strain type and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates causing meningitis in a large urban setting in Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 5, p. 1418–1422, 2014.

BERTRAND, S. *et al.* Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 8, p. 2897–2903, 2006.

BIELAK, E. *et al.* Investigation of diversity of plasmids carrying the *bla*_{TEM-52} gene. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 11, p. 2465–2474, 2011.

BIENDO, M. *et al.* Molecular diversity of *Proteus mirabilis* isolates producing extended-spectrum β -lactamases in a French university hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 5, p. 395–401, 2005.

BIRGY, A. *et al.* Community faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in French children. **BMC infectious diseases**, v. 12, p. 315, 2012.

BLANC, V. *et al.* ESBL- and plasmidic class C β -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 3–4, p. 299–304, 2006.

BLANC, V. *et al.* Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69, n. 5, p. 1231–1237, 2014.

BONNET, R. *et al.* A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1936–42, jul. 2000.

_____. Novel Cefotaximase (CTX-M-16) with Increased Catalytic Efficiency Due to Substitution Asp-240→Gly. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2269–2275, 1 ago. 2001.

____. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 1, p. 1–14, 2004.

BONOMO, R. A.; TOLMASKY, M. **Enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition**. Washington, DC: ASM Press, 2007.

BÖRJESSON, S.; EGERVÄRN, M.; *et al.* Frequent occurrence of extended-spectrum beta-lactamase- and transferable AMPC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on domestic chicken meat in Sweden. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 7, p. 2463–2466, 2013.

BÖRJESSON, S.; BENGTSSON, B.; *et al.* Spread of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates in Swedish broilers mediated by an *incl* plasmid carrying *bla*_{CTX-M-1}. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 55, n. July, p. 3, 2013.

BORTOLAIA, V. *et al.* High diversity of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 1623–1626, 2010.

BORTOLAIA, V.; BISGAARD, M.; BOJESSEN, A. M. Distribution and possible transmission of ampicillin- and nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* within the broiler industry. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3–4, p. 379–386, 2010.

BOTELHO, L. A. B. *et al.* Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 249–254, 2015.

BRASIL. **Relatório de produtos com licenças vigentes (04/2014)**. Brasília, DF: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/produtos-veterinarios>>.

____. **Resultado Geral do monitoramento PNCRC, ano de 2014**. Brasília, DF: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>>.

BRASME, L. *et al.* Incidence of class A extended-spectrum β -lactamases in Champagne-Ardenne (France): A 1 year prospective study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 956–964, 2007.

BRÉCHET, C. *et al.* Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* into the environment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 12, p. 1658–1665, 2014.

BRENNER, D. J.; FARMER III, J. J. Family I. Enterobacteriaceae. *In*: GARRITY, G. *et al.* (Eds.). . **Bergey's Manual[®] of Systematic Bacteriology. Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria.** 2nd. ed. New York, NY: Springer-Verlag New York Inc., 2005. p. 607–624.

BRET, L. *et al.* Chromosomally Encoded AmpC-Type β -Lactamase in a Clinical Isolate of *Proteus mirabilis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 5, p. 1110–1114, 1998.

BRIÑAS, L. *et al.* Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 β -Lactamases in *Escherichia coli* Fecal-Sample Isolates from Healthy Chickens. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 6, p. 2056–2058, 2003.

BROWNING, M. C.; TUNE, B. M. Reactivity and binding of beta-lactam antibiotics in rabbit renal cortex. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 226, n. 3, p. 640–4, set. 1983.

BUENO, M. F. C. *et al.* Complete sequences of multidrug resistance plasmids bearing *rmtD1* and *rmtD2* 16S rRNA methyltransferase genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1928–1931, 2016.

BUSH, K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 32, n. 7, p. 1085–9, 1 abr. 2001.

BUSH, K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. **Critical care (London, England)**, v. 14, n. 3, p. 224, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.

BUSH, K.; PALZKILL, T.; JACOBY, G. A. **β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes**. Disponível em: <<http://www.lahey.org/studies/>>. Acesso em: 21 set. 2016.

CAMPANA, E. H. *et al.* Frequency of plasmid-mediated AmpC in Enterobacteriaceae isolated in a Brazilian Teaching Hospital. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 44, n. 2, p. 477–80, 2013.

CANTÓN, R. *et al.* Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. SUPPL. 1, p. 144–153, 2008.

CANTÓN, R.; COQUE, T. M. The CTX-M beta-lactamase pandemic. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 466–475, 2006.

CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. **Front Microbiol**, v. 3, p. 110, 2012.

CAPOZZI, V.; SPANO, G. Horizontal gene transfer in the gut: Is it a risk? **Food Research International**, v. 42, n. 10, p. 1501–1502, 2009.

CARATTOLI, A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. **Veterinary research**, v. 32, n. 3–4, p. 243–59, 2001.

CARATTOLI, A. *et al.* Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **J Microbiol Methods**, v. 63, n. 3, p. 219–228, 2005.

_____. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in Rome, Italy. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 1, p. 103–108, 2008.

CARATTOLI, A. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14 Suppl 1, p. 117–23, jan. 2008.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2227–2238, 2009.

_____. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. **Int J Med Microbiol**, v. 301, n. 8, p. 654–658, 2011.

_____. Plasmids and the spread of resistance. **Int J Med Microbiol**, v. 303, n. 6–7, p. 298–304, 2013.

CARMO FILHO, J. R. DO *et al.* Prevalence and genetic characterization of *bla*_{CTX-M} among *Klebsiella pneumoniae* isolates collected in an intensive care unit in Brazil. **J Chemother**, v. 20, n. 5, p. 600–603, 2008.

CARRÈR, A. *et al.* Outbreak of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in the intensive care unit of a French hospital. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 15, n. 1, p. 47–54, mar. 2009.

CARRÈR, A.; NORDMANN, P. *Klebsiella pneumoniae* CTX-M-15: Vers une modification de l'épidémiologie des β -lactamases à spectre étendu. **Pathologie Biologie**, v. 59, n. 6, p. 133–135, 2011.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D. *et al.* Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2475–6, 2014.

CASELLA, T. *et al.* 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.

CASFM. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Paris: [s.n.]. Disponible em: <http://www.sfm-microbiologie.org/page/page/showpage/page_id/90.html>.

CASFM-VET. **Antibiogramme Veterinaire du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie**. Paris: [s.n.]. Disponível em: <http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_VET2015.pdf>.

CERGOLE-NOVELLA, M. C. *et al.* First description of *bla*_{CTX-M-14}- and *bla*_{CTX-M-15}-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 16, n. 3, p. 177–184, 2010.

CHAGAS, T. P. G. *et al.* Diversity of genotypes in CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in different hospitals in Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 420–5, 2011.

CHMELNITSKY, I. *et al.* CTX-M-2 and a new CTX-M-39 enzyme are the major extended-spectrum beta-lactamases in multiple *Escherichia coli* clones isolated in Tel Aviv, Israel. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 11, p. 4745–4750, 2005.

CLEMENTE, L. *et al.* Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases among isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from food-producing animals and food products, in Portugal. **Int J Food Microbiol**, v. 167, n. 2, p. 221–228, 2013.

CLEMENTE, L. *et al.* Antimicrobial susceptibility and oxymino- β -lactam resistance mechanisms in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from different animal sources. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 7, p. 574–583, 2015.

CLERMONT, O. *et al.* The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environ Microbiol Rep**, v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4, 2000.

CLIMACO, E. C.; MINARINI, L. A.; DARINI, A. L. DA C. CTX-M-producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years? **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 68, n. 2, p. 186–189, 2010.

CLOECKAERT, A. *et al.* Dissemination of an extended-spectrum-beta-lactamase *bla*_{TEM-52} gene-carrying IncI1 plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 5, p. 1872–1875, 2007.

_____. IncI1 plasmid carrying extended-spectrum-beta-lactamase gene *bla*_{CTX-M-1} in *Salmonella enterica* isolates from poultry and humans in France, 2003 to 2008. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 10, p. 4484–4486, 2010.

CLSI. M100-S24. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. *In*: Wayne, PA: [s.n.]. p. 230.

COHEN STUART, J. *et al.* Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. **Int J Food Microbiol**, v. 154, n. 3, p. 212–214, 2012.

CONZA, J. DI *et al.* Novel Class 1 Integron (InS21) Carrying *bla*_{CTX-M-2} in *Salmonella enterica* Serovar Infantis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 7, p. 2257–2261, 2002.

COQUE, T. M. *et al.* Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 2, p. 195–200, fev. 2008.

COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Eurosurveillance**, v. 13, n. 47, 20 nov. 2008.

COSTA, D. *et al.* Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. **Veterinary Microbiology**, v. 138, n. 3–4, p. 339–344, 2009.

COUDRON, P. E.; MOLAND, E. S.; THOMSON, K. S. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 5, p. 1791–1796, 2000.

COUTURIER, M. *et al.* Identification and classification of bacterial plasmids. **Microbiological reviews**, v. 52, n. 3, p. 375–95, set. 1988.

D'ANDREA, M. M. *et al.* CMY-16, a novel acquired AmpC-type β -lactamase of the CMY/LAT lineage in multifocal monophyletic isolates of *Proteus mirabilis* from northern Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 618–624, 2006.

D'ANDREA, M. M. *et al.* CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. **Int J Med Microbiol**, v. 303, n. 6–7, p. 305–317, 2013.

DAHMEN, S. *et al.* Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of Enterobacteriaceae causing cattle mastitis in France. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2–4, p. 793–799, 2013.

DAHMEN, S.; HAENNI, M.; MADEC, J. Y. IncI1/ST3 plasmids contribute to the dissemination of the *bla*_{CTX-M-1} gene in *Escherichia coli* from several animal species in France. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 12, p. 3011–3012, 2012.

DALLENNE, C. *et al.* Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 3, p. 490–495, 2010.

DEPOORTER, P. *et al.* Assessment of human exposure to 3rd generation cephalosporin resistant *E. coli* (CREC) through consumption of broiler meat in Belgium. **Int J Food Microbiol**, v. 159, n. 1, p. 30–38, 2012.

DHANJI, H. *et al.* Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 12, p. 2534–2537, 2010.

_____. Variation in the genetic environments of *bla*_{CTX-M-15} in *Escherichia coli* from the faeces of travellers returning to the United Kingdom. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 5, p. 1005–1012, 2011.

DIAS, V. C. *et al.* Distribution of ESBL-producing enterobacteria associated to community-acquired monomicrobial urinary tract infections and antimicrobial susceptibility trends over a 9-year period. **J Chemother**, v. 24, n. 3, p. 178–181, 2012.

DIERIKX, C. *et al.* Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. **Vet Microbiol**, v. 145, n. 3–4, p. 273–278, 2010.

_____. Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 60–67, 2013.

DOI, Y.; PATERSON, D. L. Detection of plasmid-mediated class C beta-lactamases. **Int J Infect Dis**, v. 11, n. 3, p. 191–197, 2007.

DOLEJSKA, M. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in turkey meat production farms in the Czech Republic: National survey reveals widespread isolates with *bla*_{SHV-12} genes on IncFII plasmids. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 271–277, 2011.

DONADO-GODOY, P. *et al.* Prevalence, risk factors, and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* from commercial broiler farms in two important poultry-producing regions of Colombia. **J Food Prot**, v. 75, n. 5, p. 874–883, 2012.

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from urine samples by use of the ESBL NDP test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 10, p. 3701–3706, 2014.

DOUBLET, B. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC beta-lactamase-producing D-tartrate-positive *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B from broilers and human patients in Belgium, 2008–10. **J Antimicrob Chemother**, v. 69, n. 5, p. 1257–1264, 2014.

DOUMITH, M. *et al.* Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 9, p. 3108–3110, 2012.

DRASAR, B. S.; HILL, M. J. The significance of gut bacteria in normal people. *In*: DRASAR, B. S.; HILL, M. J. (Eds.). **Human Intestinal Flora**. London: Academic Press Inc. (London) Ltd., 1974. p. 233–238.

DRIEUX, L. *et al.* Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: Review and bench guide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. SUPPL. 1, p. 90–103, 2008.

DRIEUX, L. *et al.* Complete nucleotide sequence of the large conjugative pTC2 multireplicon plasmid encoding the VIM-1 metallo-beta-lactamase. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 1, p. 97–100, 2013.

DROPA, M. *et al.* Complex class 1 integrons harboring CTX-M-2-encoding genes in clinical Enterobacteriaceae from a hospital in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 8, p. 890–897, 2015.

_____. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. **Environmental science and pollution research international**, v. 23, n. 5, p. 4953–8, mar. 2016.

DUPONT, H. *et al.* Molecular characterization of carbapenem-nonsusceptible enterobacterial isolates collected during a prospective interregional survey in France and susceptibility to the novel ceftazidime-avibactam and aztreonam-avibactam combinations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 215–221, 2016.

DUPOUY, V. *et al.* Dominant plasmids carrying extended spectrum β -lactamases *bla*_{CTX-M} genes in genetically diverse *Escherichia coli* from slaughterhouse and urban wastewaters. **Environmental Microbiology Reports**, jul. 2016.

DUTIL, L. *et al.* Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 1, p. 48–54, 2010.

ECKERT, C. *et al.* Dissemination of CTX-M-Type β -Lactamases among Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 4, p. 1249–1255, 2004.

ECKERT, C.; GAUTIER, V.; ARLET, G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*_{CTX-M} genes. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, n. 1, p. 14–23, 2006.

EFSA. Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. **EFSA Journal**, v. 9, n. 8, p. 2322, 2011.

EGEA, P. *et al.* Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. **Int J Food Microbiol**, v. 159, n. 2, p. 69–73, 2012.

EGERVÄRN, M. *et al.* *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden. **Int J Food Microbiol**, v. 171, p. 8–14, 2014.

EISEL, W.; LINTON, R.; MURIANA, P. A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a red meat processing plant. **Food Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 273–282, jun. 1997.

ENDIMIANI, A. *et al.* First countrywide survey of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from broilers, swine, and cattle in Switzerland. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 1, p. 31–38, 2012.

ESCOBAR-PÁRAMO, P. *et al.* Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1975–1984, 2006.

EWERS, C. *et al.* Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **Int J Med Microbiol**, v. 297, n. 3, p. 163–176, 2007.

_____. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. 646–55, jul. 2012.

FERNANDES, S. A. *et al.* CTX-M-2-producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 15, n. 4, p. 317–21, dez. 2009.

FERREIRA, J. C. *et al.* IncI1/ST113 and IncI1/ST114 conjugative plasmids carrying *bla*_{CTX-M-8} in *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 80, n. 4, p. 304–306, 2014a.

_____. Detection of chromosomal *bla*_{CTX-M-2} in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 10, p. O623-6, out. 2014b.

_____. Evaluation and characterization of plasmids carrying CTX-M genes in a non-clonal population of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from poultry in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 4, p. 444–448, 2016.

FIGUEIREDO, R. *et al.* Antimicrobial Resistance and Extended-Spectrum β -Lactamases of *Salmonella enterica* Serotypes Isolated from Livestock and Processed Food in Portugal: An Update. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 2, p. 110–117, fev. 2015.

FISCHER, E. A. J. *et al.* The IncI1 plasmid carrying the *bla*_{CTX-M-1} gene persists in in vitro culture of a *Escherichia coli* strain from broilers. **BMC microbiology**, v. 14, p. 77, 2014.

FITCH, F. M. *et al.* β -Lactam Resistance Genes: Characterization, Epidemiology, and First Detection of *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-14} in *Salmonella* spp. Isolated from Poultry in Brazil-Brazil Ministry of Agriculture's Pathogen Reduction Program. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 22, n. 2, p. 164–71, mar. 2016.

FRICKE, W. F. *et al.* Antimicrobial resistance-conferring plasmids with similarity to virulence plasmids from avian pathogenic *Escherichia coli* strains in *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolates from poultry. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 18, p. 5963–5971, 2009.

FRIEDLAND, I. *et al.* Resistance in Enterobacteriaceae: results of a multicenter surveillance study, 1995-2000. **Infection control and hospital epidemiology**, v. 24, n. 8, p. 607–12, ago. 2003.

GAILLOT, O. *et al.* Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended- spectrum β -lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 1357–1360, 1998.

GARCIA, A. *et al.* Characterization of the highly variable region surrounding the *bla*_{CTX-M-9} gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, n. 5, p. 819–826, 2005.

GARCIA-FERNANDEZ, A. *et al.* Multilocus sequence typing of IncII plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. **J Antimicrob Chemother**, v. 61, n. 6, p. 1229–1233, 2008.

GARCIA-MIGURA, L. *et al.* Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 1–2, p. 1–9, 2014.

GERMOND, J. E.; VOGT, V. M.; HIRT, B. Characterization of the single-strand-specific nuclease S1 activity on double-stranded supercoiled polyoma DNA. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 43, n. 3, p. 591–600, 16 abr. 1974.

GESER, N.; STEPHAN, R.; HÄCHLER, H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 21, 2012.

GHODOUSI, A. *et al.* Extended-Spectrum β -Lactamase, AmpC-Producing, and Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* in Retail Broiler Chicken Meat, Italy. **Foodborne Pathog Dis**, v. 12, n. 7, p. 619–625, 2015.

GIBOLD, L. *et al.* Four-year epidemiological study of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a French teaching hospital. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 1, p. O20-6, 2014.

GILES, W. P. *et al.* DNA sequence analysis of regions surrounding *bla*_{CMY-2} from multiple *Salmonella* plasmid backbones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 2845–2852, 2004.

GILL, C. O.; MCGINNIS, J. C.; BADONI, M. Use of total of *Escherichia coli* counts to assess the hygienic characteristics of a beef carcass dressing process. **International journal of food microbiology**, v. 31, n. 1–3, p. 181–96, ago. 1996.

GIRLICH, D. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 14, p. 4681–4685, 2007.

GONÇALVES, L. F. *et al.* Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in the Central-Western Region, Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 6, p. 1–4, 2016.

GOREN, M. G. *et al.* Transfer of carbapenem-resistant plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in patient. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 6, p. 1014–1017, 2010.

GÖTTIG, S. *et al.* *In vivo* horizontal gene transfer of the carbapenemase OXA-48 during a nosocomial outbreak. **Clin Infect Dis**, v. 60, n. 12, p. 1808–1815, 2015.

GRAMI, R. *et al.* The *bla*_{CTX-M-1} Inc11/ST3 plasmid is dominant in chickens and pets in Tunisia. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 12, p. 2950–2952, 2013.

_____. *bla*_{CTX-M-15}-carrying F2:A-B- plasmid in *Escherichia coli* from cattle milk in Tunisia. **Microb Drug Resist**, v. 20, n. 4, p. 344–349, 2014.

GUPTA, K. *et al.* International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. **Clin Infect Dis**, v. 52, n. 5, p. e103-20, 2011.

GUTKIND, G. O. *et al.* β -lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 2, p. 164–208, 2013.

GYLES, C. L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. **Anim Health Res Rev**, v. 9, n. 2, p. 149–158, 2008.

HAENNI, M. *et al.* Spread of the *bla*_{TEM-52} gene is mainly ensured by inc11/ST36 plasmids in *Escherichia coli* isolated from cattle in France. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2774–2776, 2012.

____. High prevalence of *bla*_{CTX-M-1}/IncI1/ST3 and *bla*_{CMY-2}/IncI1/ST2 plasmids in healthy urban dogs in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5358–5362, 2014.

____. High prevalence of international ESBL CTX-M-15-producing *Enterobacter cloacae* ST114 clone in animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. February, p. 4–7, 2016.

HAN, W. *et al.* DNA microarray-based identification of serogroups and virulence gene patterns of *Escherichia coli* isolates associated with porcine postweaning diarrhea and edema disease. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 12, p. 4082–4088, 2007.

HANSEN, K. H. *et al.* Host-specific patterns of genetic diversity among IncI1-Iy and IncK plasmids encoding CMY-2 β -lactamase in *Escherichia coli* isolates from humans, poultry meat, poultry and dogs in Denmark. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 15, p. AEM.00495-16, 2016.

HANSON, N. D. AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? **J Antimicrob Chemother**, v. 52, n. 1, p. 2–4, 2003.

HARA, T. *et al.* Prevalence and molecular characterization of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from 2000 to 2010 in Japan. **The Japanese journal of antibiotics**, v. 68, n. 2, p. 75–84, abr. 2015.

HARADA, K.; ASAI, T. Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 180682, 2010.

HARADA, S. *et al.* Chromosomal integration and location on IncT plasmids of the *bla*_{CTX-M-2} gene in *Proteus mirabilis* clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 2, p. 1093–1096, 2012.

HASMAN, H. *et al.* beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, n. 1, p. 115–121, 2005.

HASMAN, H. *et al.* **Isolation of ESBL- , AmpC- and carbapenemase-producing E . coli from caecal samples.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.eurl-ar.eu/data/images/protocols/esbl_ampc_cpeprotocol_version_meat_october2015_version3.pdf>.

HAWKEY, P. M. The growing burden of antimicrobial resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 62 Suppl 1, p. i1-9, 2008.

HERNANDEZ, T. *et al.* *Salmonella enterica* serotypes isolated from imported frozen chicken meat in the Canary islands. **Journal of food protection**, v. 68, n. 12, p. 2702–6, dez. 2005.

HOEK, A. H. VAN *et al.* Comparative virulotyping of extended-spectrum cephalosporin-resistant *E. coli* isolated from broilers, humans on broiler farms and in the general population and UTI patients. **Vet Microbiol**, 2016.

HOWARD, S. J.; HOPWOOD, S.; DAVIES, S. C. Antimicrobial resistance: a global challenge. **Science translational medicine**, v. 6, n. 236, p. 236ed10, 14 maio 2014.

HUIJBERS, P. M. *et al.* Extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and people living and/or working on broiler farms: prevalence, risk factors and molecular characteristics. **J Antimicrob Chemother**, v. 69, n. 10, p. 2669–2675, 2014.

HUIJBERS, P. M. C. *et al.* Transmission dynamics of extended-spectrum β -lactamase and AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a broiler flock without antibiotic use. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 131, p. 12–19, 2016.

ICMSF. **Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities.** 2nd. ed. New York, NY: Publishers, Kluwer Academic & Plenum, 2005.

IZDEBSKI, R. *et al.* Clonal structure, extended-spectrum β -lactamases, and acquired AmpC-type cephalosporinases of *Escherichia coli* populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 309–16, jan. 2013.

JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 1, p. 161–82, 2009.

JAKOBSEN, L. *et al.* Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. **Int J Food Microbiol**, v. 142, n. 1–2, p. 264–272, 2010.

JAKOBSEN, L. *et al.* Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 6, p. 1121–1129, 2012.

JAKOBSEN, L.; HAMMERUM, A. M.; FRIMODT-MOLLER, N. Detection of clonal group A *Escherichia coli* isolates from broiler chickens, broiler chicken meat, community-dwelling humans, and urinary tract infection (UTI) patients and their virulence in a mouse UTI model. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 24, p. 8281–8284, 2010.

JANVIER, F. *et al.* Faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteria among soldiers at admission in a French military hospital after aeromedical evacuation from overseas. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 10, p. 1719–23, out. 2014.

JOHNSON, J. R. *et al.* Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status. **The Journal of infectious diseases**, v. 194, n. 1, p. 71–8, 1 jul. 2006.

_____. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 6, p. 838–46, jun. 2007.

JOHNSON, J. R. *et al.* Molecular Analysis of *Escherichia coli* from retail meats (2002-2004) from the United States National Antimicrobial Resistance Monitoring System. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 2, p. 195–201, 2009.

_____. Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967-2009. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 4, p. 598–607, 2012.

JOHNSON, T. J. *et al.* Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 6, p. 1976–1983, 2007.

JONES-DIAS, D. *et al.* New Class 2 Integron In 2-4 Among IncI1-Positive *Escherichia coli* Isolates Carrying ESBL and PMA β Genes from Food Animals in Portugal. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 1, p. 36–39, 2016.

KAESBOHRER, A. *et al.* Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, n. SUPPL.2, p. 158–165, 2012.

KAMEYAMA, M. *et al.* Prevalence and epidemiological relationship of CMY-2 AmpC β -lactamase and CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from broiler farms in Japan. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 75, n. 8, p. 1009–15, 2013.

KANG, M.-S.; BESSER, T. E.; CALL, D. R. Variability in the Region Downstream of the *bla*_{CMY-2} β -Lactamase Gene in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Plasmids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1590–1593, 2006.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.

KARFUNKEL, D. *et al.* The emergence and dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* sequence type 131 causing community-onset bacteremia in Israel. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 32, n. 4, p. 513–521, 2013.

KASSAKIAN, S. Z.; MERMEL, L. A. Changing epidemiology of infections due to extended spectrum beta-lactamase producing bacteria. **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 3, n. 1, p. 9, 2014.

KAWAMURA, K. *et al.* Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases and *Escherichia coli* isolated from retail foods including chicken meat in Japan. **Foodborne Pathogen Dis**, v. 11, n. 2, p. 104–110, 2014.

KILONZO-NTHENGE, A.; ROTICH, E.; NAHASHON, S. N. Evaluation of drug-resistant Enterobacteriaceae in retail poultry and beef. **Poult Sci**, v. 92, n. 4, p. 1098–1107, 2013.

KLUYTMANS, J. A. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. **Clin Infect Dis**, v. 56, n. 4, p. 478–487, 2013.

KOBAYASHI, R. K. T. *et al.* EcoR phylogenetic analysis and virulence genotyping of avian pathogenic *Escherichia coli* strains and *Escherichia coli* isolates from commercial chicken carcasses in southern Brazil. **Foodborne pathogens and disease**, v. 8, n. 5, p. 631–4, maio 2011.

KOGA, V. L. *et al.* Evaluation of the Antibiotic Resistance and Virulence of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chicken Carcasses in 2007 and 2013 from Parana, Brazil. **Foodborne Pathog Dis**, v. 12, n. 6, p. 479–485, 2015.

KOLA, A. *et al.* High prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 11, p. 2631–2634, 2012.

KONINGSTEIN, M. *et al.* The interaction between prior antimicrobial drug exposure and resistance in human *Salmonella* infections. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 8, p. 1819–1825, 2010.

LAHLAOUI, H.; HAJ KHALIFA, A. BEN; MOUSSA, M. BEN. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL). **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 9, p. 400–404, 2014.

LAMMIE, S. L.; HUGHES, J. M. Antimicrobial Resistance, Food Safety, and One Health: The Need for Convergence. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 7, n. 1, p. 287–312, 28 fev. 2016.

LARTIGUE, M. F. *et al.* *In vitro* analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene *bla*_{CTX-M} of *Kluyvera ascorbata*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 4, p. 1282–1286, 2006.

LARTIGUE, M. F.; FORTINEAU, N.; NORDMANN, P. Spread of novel expanded-spectrum β -lactamases in enterobacteriaceae in a university hospital in the Paris area, France. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 7, p. 588–591, 2005.

LARTIGUE, M. F.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Diversity of genetic environment of *bla*_{CTX-M} genes. **FEMS Microbiol Lett**, v. 234, n. 2, p. 201–207, 2004.

LAYTON, A. N.; GALYOV, E. E. *Salmonella*-induced enteritis: molecular pathogenesis and therapeutic implications. **Expert Rev Mol Med**, v. 9, n. 18, p. 1–17, 2007.

LEIGUE, L. *et al.* MDR ST2179-CTX-M-15 *Escherichia coli* co-producing RmtD and AAC(6')-Ib-cr in a horse with extraintestinal infection, Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 4, p. 1263–1265, 2015.

LEISTNER, R. *et al.* Risk factors associated with the community-acquired colonization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) positive *Escherichia coli*. An exploratory case-control study. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74323, 2013.

LEITE, A. M. DE O.; FRANCO, R. M. Coliformes totais e *Escherichia coli* em coxas de frango comercializados no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 2, p. 80–83, 2006.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A. *et al.* Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 6, p. 873–880, jun. 2011.

LI, J. *et al.* Dissemination of Cefotaxime-M-Producing *Escherichia coli* Isolates in Poultry Farms, But Not Swine Farms, in China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 11, p. 1387–1392, nov. 2010.

LIAO, W. *et al.* Survey for beta-lactamase among bacterial isolates from Guangzhou, China hospitals between 2005-2006. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 63, n. 5, p. 225–229, 2010.

LIM, S. C. *et al.* Protective effect of morin on the imipenem-induced nephrotoxicity in rabbits. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 8, p. 1060–1065, 2008.

LINDSEY, R. L. *et al.* Inc A/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 7, p. 1908–1915, 2009.

LIU, S.-L.; HESSEL, A.; SANDERSON, K. E. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 14, p. 6874–8, 1993.

LIVERMORE, D. M. *et al.* CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, n. 2, p. 165–174, 2007.

_____. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. **Korean J Intern Med**, v. 27, n. 2, p. 128–142, 2012.

LOPES, A. C. S. *et al.* *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 163–7, mar. 2010.

LV, L. *et al.* Genetic characterization of IncI2 plasmids carrying *bla*_{CTX-M-55} spreading in both pets and food animals in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2824–2827, 2013.

LYHS, U. *et al.* Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in poultry meat products on the Finnish retail market. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 54, p. 64, 2012.

MACHADO, E. *et al.* High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, n. 6, p. 1370–1374, 2007.

_____. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 2, p. 296–302, 2008.

MACIUCA, I. E. *et al.* High Prevalence of *Escherichia coli*-Producing CTX-M-15 Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Poultry and Human Clinical Isolates in Romania. **Microb Drug Resist**, v. 21, n. 6, p. 651–662, 2015.

MACVANE, S. H.; TUTTLE, L. O.; NICOLAU, D. P. Impact of extended-spectrum β -lactamase-producing organisms on clinical and economic outcomes in patients with urinary tract infection. **J Hosp Med**, v. 9, n. 4, p. 232–238, 2014.

MADEC, J. Y. *et al.* Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-spectrum cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae strains from cattle in France. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 4, p. 1566–1567, 2008.

MADEC, J. Y. *et al.* Extended-spectrum β -lactamase *bla*_{CTX-M-1} gene carried on an IncII plasmid in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in cattle in France. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 4, p. 942–944, 2011.

MADEC, J. Y. *et al.* Non-ST131 *Escherichia coli* from cattle harbouring human-like *bla*_{CTX-M-15}-carrying plasmids. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 3, p. 578–581, 2012.

MADEC, J.-Y. *et al.* High Prevalence of the Animal-Associated *bla*_{CTX-M-1} IncII/ST3 Plasmid in Human *Escherichia coli* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5860–5861, 2015.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Brock Biology of Microorganisms**. 14th editi ed. [s.l.] Pearson, 2014.

MAGIORAKOS, A.-P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 268–81, mar. 2012.

MAIDEN, M. C. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 561–588, 2006.

MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 152, n. 1–2, p. 2–12, 2013.

MALUTA, R. P. *et al.* Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra-intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105016, 2014.

MAMMERI, H. *et al.* Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 11, p. 4556–4560, 2010.

MANGES, A. R. *et al.* Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: a case-control study. **Foodborne pathogens and disease**, v. 4, n. 4, p. 419–31, 2007.

MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clin Infect Dis**, v. 55, n. 5, p. 712–719, 2012.

MARCADÉ, G. *et al.* Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 1, p. 67–71, 2009.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 4, p. 718–733, 2011.

MARTINS, R. P. *et al.* Prevalence of enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in pigs slaughtered in Mato Grosso, Brazil. **Journal of infection in developing countries**, v. 5, n. 2, p. 123–7, fev. 2011.

MATASEJE, L. F. *et al.* Comparison of CMY-2 plasmids isolated from human, animal, and environmental *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from Canada. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 67, n. 4, p. 387–391, 2010.

MATTIELLO, S. P. *et al.* Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* strains isolated from Brazilian poultry production. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 5, p. 1227–1238, 3 nov. 2015.

MCEWEN, S. A.; FEDORKA-CRAY, P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 34 Suppl 3, p. S93–S106, 1 jun. 2002.

MEDDEB, M. *et al.* Comparison of routine use of two chromogenic media ChromID CPS (bioMérieux) and UriSelect4 (Bio-Rad) for the detection of *Escherichia coli* and major uropathogenics in urine. **Annales de biologie clinique**, v. 72, n. 2, p. 224–30, 2014.

MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathog Dis**, v. 10, n. 11, p. 916–932, 2013.

MENDES, F. R. *et al.* Utilização de antimicrobianos na avicultura. **Revista Eletrônica Nutrime**, v. 10, n. 2, p. 2352–2389, 2013.

MESA, R. J. *et al.* Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 211–215, 2006.

MEUNIER, D. *et al.* CTX-M-1- and CTX-M-15-type beta-lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. **Int J Antimicrob Agents**, v. 28, n. 5, p. 402–407, 2006.

MICHAEL, G. B. *et al.* Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates collected from diseased food-producing animals in the GERM-Vet monitoring program 2008–2014. **Veterinary Microbiology**, 2016.

MINARINI, L. A. *et al.* Predominance of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 65, n. 2, p. 202–206, 2009.

MINARINI, L. A. R. *et al.* Prevalence of community-occurring extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Current microbiology**, v. 54, n. 5, p. 335–41, maio 2007.

MITCHELL, N. M. *et al.* Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. **Appl Environ Microbiol**, v. 81, n. 3, p. 1177–1187, 2015.

MODI, S. R.; COLLINS, J. J.; RELMAN, D. A. Antibiotics and the gut microbiota. **J Clin Invest**, v. 124, n. 10, p. 4212–4218, 2014.

MOISSENET, D. *et al.* Meningitis caused by *Escherichia coli* producing TEM-52 extended-spectrum β -lactamase within an extensive outbreak in a neonatal ward: Epidemiological investigation and characterization of the strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 2459–2463, 2010.

MOLLENKOPF, D. F. *et al.* *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* Harboring *bla*_{CMY} in Retail Beef and Pork Products. **Foodborne Pathog Dis**, v. 8, n. 2, p. 333–336, 2011.

MORA, A. *et al.* Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 21, p. 6991–6997, 2010.

_____. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans. **Vet Microbiol**, v. 167, n. 3–4, p. 506–512, 2013.

MOYAERT, H. *et al.* Antimicrobial resistance monitoring projects for zoonotic and indicator bacteria of animal origin: Common aspects and differences between EASSA and EFSA. **Veterinary Microbiology**, v. 171, n. 3–4, p. 279–283, 2014.

MSHANA, S. E. *et al.* Molecular epidemiology and characterization of an outbreak causing *Klebsiella pneumoniae* clone carrying chromosomally located *bla*_{CTX-M-15} at a German University-Hospital. **BMC Microbiol**, v. 15, p. 122, 2015.

NAAS, T.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14 Suppl 1, p. 42–52, jan. 2008.

NASEER, U. *et al.* Sporadic occurrence of CMY-2-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* of ST-complexes 38 and 448, and ST131 in Norway. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 2, p. 171–178, 2010.

NAVON-VENEZIA, S. *et al.* Dissemination of the CTX-M-25 family beta-lactamases among *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* and identification of the novel enzyme CTX-M-41 in *Proteus mirabilis* in Israel. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 2, p. 289–295, 2008.

NEWELL, D. G. *et al.* Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **Int J Food Microbiol**, v. 139 Suppl, p. S3-15, 2010.

NICOLAS-CHANOINE, M. H. *et al.* Patient's origin and lifestyle associated with CTX-M-Producing *Escherichia coli*: A Case-Control-Control study. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.

NICOLAS-CHANOINE, M. H. *et al.* 10-fold increase (2006-11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a parisian check-up centre. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 3, p. 562–568, 2013.

NICOLAS-CHANOINE, M. H.; BERTRAND, X.; MADEC, J. Y. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 3, p. 543–574, 2014.

NICOLAS-CHANOINE, M.-H.; JARLIER, V. Extended-spectrum beta-lactamases in long-term-care facilities. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14 Suppl 1, p. 111–6, 2008.

NOGUEIRA, K. DA S. *et al.* Emergence of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica**, v. 32, n. 2, p. 87–92, 2014.

_____. Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 2, p. 162–169, 2015.

NORDSTROM, L.; LIU, C. M.; PRICE, L. B. Foodborne urinary tract infections: a new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness. **Front Microbiol**, v. 4, p. 29, 2013.

NOVAIS, A. *et al.* 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. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 2, p. 796–799, 2007.

NOVICK, R. P. *et al.* Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. **Bacteriological reviews**, v. 40, n. 1, p. 168–89, mar. 1976.

____. Plasmid incompatibility. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 4, p. 381–95, dez. 1987.

NÜESCH-INDERBINEN, M.; STEPHAN, R. Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in the Human-Livestock Environment. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 3, p. 1–9, 2016.

OIE. **List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance**. Paris: [s.n.]. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf>.

OJER-USOZ, E. *et al.* Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in meat products sold in Navarra, Spain. **Meat Sci**, v. 93, n. 2, p. 316–321, 2013.

OLIVEIRA, S. *et al.* Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 849–52, mar. 2014.

OLIVEIRA GARCIA, D. DE *et al.* Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 5, p. 1790–1793, 2008.

OLIVER, A. *et al.* CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among Enterobacteriaceae in a Spanish hospital. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 4, p. 1567–1571, 2005.

OLSEN, R. H. *et al.* Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 9457, n. May 2014, p. 1–10, 2014.

OUAZZANI CHAHDI, A.; GABANT, P.; COUTURIER, M. Molecular analysis of RepHI1B, a replicon specific to IncHI1 plasmids. **Molecular & general genetics : MGG**, v. 255, n. 5, p. 477–86, ago. 1997.

OVERDEVEST, I. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 7, p. 1216–1222, 2011.

PACHOLEWICZ, E. *et al.* Reduction of extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* through processing in two broiler chicken slaughterhouses. **Int J Food Microbiol**, v. 215, p. 57–63, 2015.

PARTRIDGE, S. R. *et al.* Complete sequence of pJIE143, a pir-type plasmid carrying *ISEcp1-bla_{CTX-M-15}* from an *Escherichia coli* ST131 isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 12, p. 5933–5935, 2011.

PASQUALI, F. *et al.* Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates of animal and environmental origins from an integrated poultry production chain. **Vet Microbiol**, v. 178, n. 3–4, p. 230–237, 2015.

PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **Am J Infect Control**, v. 34, n. 5 Suppl 1, p. S20-8-73, 2006.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 4, p. 657–686, 2005.

PAVEZ, M. *et al.* Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC beta-lactamase in Brazil. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 12, p. 1590–1592, 2008.

PAYNE, M.; ROSCOE, D. Evaluation of two chromogenic media for the isolation and identification of urinary tract pathogens. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 34, n. 2, p. 303–308, 2015.

PEHLIVANLAR ÖNEN, S. *et al.* Prevalence of β -Lactamase Producing *Escherichia coli* from Retail Meat in Turkey. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 9, p. 2023–2029, 2015.

PEIRANO, G. *et al.* Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 58, n. 2, p. 305–309, 2006.

____. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1039–43, jul. 2011.

PÉREZ-LOSADA, M. *et al.* Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. **Infect Genet Evol**, v. 16, p. 38–53, 2013.

PÉREZ-PÉREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 6, p. 2153–2162, 2002.

PERSOONS, D. *et al.* Risk factors for ceftiofur resistance in *Escherichia coli* from Belgian broilers. **Epidemiol Infect**, v. 139, n. 5, p. 765–771, 2011.

PHE. **UK Standards for microbiology Investigations - Identification of Enterobacteriaceae**. London: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>>.

PITOUT, J. D. D. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 6, n. 5, p. 657–669, 2008.

PLATELL, J. L. *et al.* Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. **Vet Microbiol**, v. 153, n. 1–2, p. 99–108, 2011.

POETA, P. *et al.* Genetic characterization of antibiotic resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* carrying extended-spectrum beta-lactamases recovered from diarrhoeic rabbits. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 3, p. 162–170, 2010.

POIREL, L. *et al.* CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 12, p. 3355–3361, 2001.

POIREL, L.; BONNIN, R. A.; NORDMANN, P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative rods. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 5, p. 883–893, 2012.

- POIREL, L.; GNIADKOWSKI, M.; NORDMANN, P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 1031–1034, 2002.
- POWER, P. *et al.* Description of In116, the first *bla*_{CTX-M-2}-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 4, p. 461–465, 2005.
- PRESCOTT, J. F. Antimicrobial use in food and companion animals. **Anim Health Res Rev**, v. 9, n. 2, p. 127–133, 2008.
- PRICE, L. B. *et al.* The persistence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in poultry production. **Environ Health Perspect**, v. 115, n. 7, p. 1035–1039, 2007.
- PRUIMBOOM-BREES, I. M. *et al.* Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 19, p. 10325–10329, 2000.
- QUEIROZ, M. L. *et al.* Characterization of extended-spectrum beta-lactamases, antimicrobial resistance genes, and plasmid content in *Escherichia coli* isolates from different sources in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 74, n. 1, p. 91–94, 2012.
- RAMCHANDANI, M. *et al.* Possible animal origin of human-associated, multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 40, n. 2, p. 251–7, 15 jan. 2005.
- RANDALL, L. P. *et al.* Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum beta-lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 1, p. 86–95, 2011.
- RANJBAR, R. *et al.* Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. **The new microbiologica**, v. 37, n. 1, p. 1–15, jan. 2014.
- REICH, F.; ATANASSOVA, V.; KLEIN, G. Extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 8, p. 1253–1259, 2013.

RIAÑO, I. *et al.* Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. **J Antimicrob Chemother**, v. 58, n. 4, p. 844–847, 2006.

RICHTER, S. N. *et al.* Transfer of KPC-2 Carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in a patient: first case in Europe. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 5, p. 2040–2042, 2011.

ROCHA, D. A. C. *et al.* Frequency of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Urine Samples in São Paulo, Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 321–327, jun. 2016.

ROCHA, F. R.; PINTO, V. P. T.; BARBOSA, F. C. B. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 22, n. 4, p. 301–11, jun. 2016.

RODRIGUES, C. *et al.* Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: a successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK). **Int J Med Microbiol**, v. 304, n. 8, p. 1100–1108, 2014.

RODRÍGUEZ, I. *et al.* Extended-spectrum β -lactamases and AmpC β -lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07. **J Antimicrob Chemother**, v. 64, n. 2, p. 301–309, 2009.

RODRÍGUEZ, M. M. *et al.* Characterisation of KLUA-9, a beta-lactamase from extended-spectrum cephalosporin-susceptible *Kluyvera ascorbata*, and genetic organisation of *bla*_{KLUA-9}. **Int J Antimicrob Agents**, v. 29, n. 3, p. 332–337, 2007.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E. *et al.* Characterizing the APEC pathotype. **Vet Res**, v. 36, n. 2, p. 241–256, 2005.

ROJAS, T. C. G. *et al.* *In silico* phylogenetic and virulence gene profile analyses of avian pathogenic *Escherichia coli* genome sequences. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 129–133, fev. 2014.

RUBIN, J. E.; PITOUT, J. D. Extended-spectrum beta-lactamase, carbapenemase and AmpC producing Enterobacteriaceae in companion animals. **Vet Microbiol**, v. 170, n. 1–2, p. 10–18, 2014.

RUPPÉ, E. *et al.* Clinical predictive values of extended-spectrum beta-lactamase carriage in patients admitted to medical wards. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 319–25, mar. 2012.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753–4, maio 2000.

SALADIN, M. *et al.* Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. **FEMS microbiology letters**, v. 209, n. 2, p. 161–8, 9 abr. 2002.

SALLEM, R. BEN *et al.* Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and CMY-2-producing *Escherichia coli* Isolates from healthy food-producing animals in Tunisia. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 12, p. 1137–1142, 2012.

SCHAIK, W. VAN. The human gut resistome. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 370, n. 1670, p. 20140087, 2015.

SCHNEIDER, T.; SAHL, H. G. An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. **Int J Med Microbiol**, v. 300, n. 2–3, p. 161–169, 2010.

SCHUMACHER, H.; SCHEIBEL, J.; MOLLER, J. K. Cross-resistance patterns among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with decreased susceptibility to cefuroxime. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 215–21, ago. 2000.

SEIFFERT, S. N. *et al.* Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? **Drug Resist Updat**, v. 16, n. 1–2, p. 22–45, 2013.

SEKI, L. M. *et al.* 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.

SENNATI, S. *et al.* Changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 11, p. 6003–6005, 2012.

SHERLEY, M.; GORDON, D. M.; COLLIGNON, P. J. Species differences in plasmid carriage in the Enterobacteriaceae. **Plasmid**, v. 49, n. 1, p. 79–85, jan. 2003.

SHIBATA, N. *et al.* PCR classification of CTX-M-type beta-lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 2, p. 791–795, 2006.

SHTERZER, N.; MIZRAHI, I. The animal gut as a melting pot for horizontal gene transfer. **Canadian journal of microbiology**, v. 61, n. 9, p. 603–5, set. 2015.

SHULMAN, S. T.; FRIEDMANN, H. C.; SIMS, R. H. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? **Clin Infect Dis**, v. 45, n. 8, p. 1025–1029, 2007.

SIDJABAT, H. E.; PATERSON, D. L. Multidrug-resistant *Escherichia coli* in Asia: epidemiology and management. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 13, n. 5, p. 575–591, 4 maio 2015.

SILVA, K. C. *et al.* Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase CTX-M-2-producing *Salmonella enterica* serovars Schwarzengrund and Agona in poultry farms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 7, p. 3458–3459, 2013.

SILVA, K. C. *et al.* First Characterization of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* Strains Belonging to Sequence Type (ST) 410, ST224, and ST1284 from Commercial Swine in South America. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2505–8, abr. 2016.

SMET, A. *et al.* Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* Isolates in Belgian broiler farms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 4, p. 1238–1243, 2008.

_____. Comparative analysis of extended-spectrum- β -lactamase-carrying plasmids from different members of Enterobacteriaceae isolated from poultry, pigs and humans: evidence for a shared β -lactam resistance gene pool? **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 6, p. 1286–1288, 2009.

_____. Broad-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. **FEMS Microbiol Rev**, v. 34, n. 3, p. 295–316, 2010.

SOLÀ-GINÉS, M. *et al.* Diversity of multi-drug resistant avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Causing outbreaks of colibacillosis in broilers during 2012 in Spain. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–14, 2015.

SONG, W. *et al.* Chromosome-encoded AmpC and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Proteus mirabilis* from Korea. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 4, p. 1414–1419, 2011.

SOSTARICH, A. M. *et al.* Impact of multiresistance of gram-negative bacteria in bloodstream infection on mortality rates and length of stay. **Infection**, v. 36, n. 1, p. 31–35, 2008.

SOULSBY, L. Antimicrobials and animal health: a fascinating nexus. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. Supplement 1, p. i77–i78, 2007.

SPARO, M. *et al.* High-level resistance to gentamicin: genetic transfer between *Enterococcus faecalis* isolated from food of animal origin and human microbiota. **Lett Appl Microbiol**, v. 54, n. 2, p. 119–125, 2012.

STAPLETON, A. E. Urinary tract infection pathogenesis: host factors. **Infect Dis Clin North Am**, v. 28, n. 1, p. 149–159, 2014.

STECHEER, B. *et al.* Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 4, p. 1269–1274, 2012.

STECHEER, B.; MAIER, L.; HARDT, W. D. “Blooming” in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 277–284, 2013.

TADESSE, D. A. *et al.* Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 5, p. 741–749, 2012.

TALBOT, G. H. *et al.* Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 42, n. 5, p. 657–668, 2006.

TANEJA, N. *et al.* Cephalosporin-resistant *Shigella flexneri* over 9 years (2001-09) in India. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 6, p. 1347–1353, 2012.

TEICHMANN, A. *et al.* Antibiotic resistance and detection of the *sul2* gene in urinary isolates of *Escherichia coli* in patients from Brazil. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, n. 1, p. 39–43, 2014.

TENOVER, F. C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233–9, set. 1995.

THIEBAUT, A. C. *et al.* Variability of intestinal colonization with third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae and antibiotic use in intensive care units. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 6, p. 1525–1536, 2012.

TIAN, G.-B. *et al.* Detection of CTX-M-15, CTX-M-22, and SHV-2 Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBLs) in *Escherichia coli* Fecal-Sample Isolates from Pig Farms in China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 3, p. 297–304, abr. 2009.

TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol Rev**, v. 35, n. 5, p. 912–935, 2011.

TOLLENTINO, F. M. *et al.* 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. **Microb Drug Resist**, v. 17, n. 1, p. 7–16, 2011.

USITC. **Brazil: Competitive Factors in Brazil Affecting U.S. and Brazilian Agricultural Sales in Selected Third Country Markets.** Washington, DC: [s.n.]. Disponível em: <https://www.usitc.gov/secretary/fed_reg_notices/332.htm>.

VALENTIN, L. *et al.* Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. **Int J Med Microbiol**, v. 304, n. 7, p. 805–816, 2014.

VANNI, M. *et al.* Fluoroquinolone resistance and molecular characterization of *gyrA* and *parC* quinolone resistance-determining regions in *Escherichia coli* isolated from poultry. **Poult Sci**, v. 93, n. 4, p. 856–863, 2014.

VERDET, C. *et al.* Genetic context of plasmid-carried *bla*_{CMY-2-like} genes in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 4002–4006, 2009.

VIEIRA, A. R. *et al.* Association between antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals and blood stream isolates from humans in Europe: an ecological study. **Foodborne Pathog Dis**, v. 8, n. 12, p. 1295–1301, 2011.

VILA, J.; MARCOS, M. A.; JIMENEZ DE ANTA, M. T. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. **Journal of Medical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 482–489, 1 jun. 1996.

VILLA, L. *et al.* Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 12, p. 2518–2529, 2010.

VINCENT, C. *et al.* Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 1, p. 88–95, 2010.

VOGT, D. *et al.* Occurrence and genetic characteristics of third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in Swiss retail meat. **Microb Drug Resist**, v. 20, n. 5, p. 485–494, 2014.

VOGWILL, T.; MACLEAN, R. C. The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. **Evol Appl**, v. 8, n. 3, p. 284–295, 2015.

VOLKOVA, V. V *et al.* Mathematical model of plasmid-mediated resistance to ceftiofur in commensal enteric *Escherichia coli* of cattle. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36738, 2012.

WANG, J. *et al.* Molecular characterization of *bla*_{ESBL}-harboring conjugative plasmids identified in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from food-producing animals and healthy humans. **Front Microbiol**, v. 4, p. 188, 2013.

WARREN, R. E. *et al.* Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK. **J Antimicrob Chemother**, v. 61, n. 3, p. 504–508, 2008.

WEILL, F. X. *et al.* Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 12, p. 5767–5773, 2004.

WEILL, F.-X. *et al.* Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from humans in France (1993 to 2003). **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 3, p. 700–8, mar. 2006.

WHICHARD, J. M. *et al.* Evaluation of antimicrobial resistance phenotypes for predicting multidrug-resistant *Salmonella* recovered from retail meats and humans in the United States. **Journal of food protection**, v. 73, n. 3, p. 445–51, mar. 2010.

WHO. **Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe.**

Copenhagen: [s.n.]. Disponível em:

<<http://www.euro.who.int/en/publications/abstracts/tackling-antibiotic-resistance-from-a-food-safety-perspective-in-europe>>.

_____. **Critically important antimicrobials for human medicine - 3rd review.** Geneva: [s.n.].

Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/areas_work/antimicrobial-resistance/cia/en/>.

_____. **Tacking foodborne antimicrobial resistance globally through integrated surveillance.** Geneva: [s.n.].

WIRTH, T. *et al.* Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1136–1151, 2006.

WOERTHER, P. L. *et al.* Trends in human fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 4, p. 744–758, 2013.

XU, X. *et al.* Prevalence and characterization of cefotaxime and ciprofloxacin co-resistant *Escherichia coli* isolates in retail chicken carcasses and Ground Pork, China. **Microb Drug Resist**, v. 20, n. 1, p. 73–81, 2014.

YAGI, T. *et al.* Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 6, p. 2551–2558, 2005.

YANG, X. *et al.* F33: A-, B-, IncHI2/ST3, and IncI1/ST71 plasmids drive the dissemination of *fosA3* and *bla*_{CTX-M-55/-14/-65} in *Escherichia coli* from chickens in China. **Front Microbiol**, v. 5, p. 688, 2014.

ZARFEL, G. *et al.* Multiresistant bacteria isolated from chicken meat in Austria. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 12, p. 12582–12593, 2014.

ZHANG, J. *et al.* Nationwide high prevalence of CTX-M and an increase of CTX-M-55 in *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset infections in Chinese county hospitals. **BMC Infect Dis**, v. 14, p. 659–668, 2014.

ZHANG, T. *et al.* Survey on tetracycline resistance and antibiotic-resistant genotype of avian *Escherichia coli* in North China. **Poultry science**, v. 91, n. 11, p. 2774–7, 2012.

ZHAO, W. H.; HU, Z. Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria. **Crit Rev Microbiol**, v. 39, n. 1, p. 79–101, 2013.

ZHENG, H. *et al.* Prevalence and characterisation of CTX-M beta-lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China. **Int J Antimicrob Agents**, v. 39, n. 4, p. 305–310, 2012.

ZIMBRO, M. J. *et al.* **Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media.** 2nd edition ed. Sparks, MD: Becton, Dickinson and Company, 2009.

ZIOGA, A. *et al.* Evidence for chromosomal and plasmid location of CMY-2 cephalosporinase gene in *Salmonella* serotype Typhimurium. **J Antimicrob Chemother**, v. 61, n. 6, p. 1389–1390, 2008.

ZOGG, A. L. *et al.* Characteristics of ESBL-producing Enterobacteriaceae and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from Swiss and imported raw poultry meat collected at retail level. **Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde**, v. 158, n. 6, p. 451–456, 2016.

ZURFLUH, K.; JAKOBI, G.; *et al.* Replicon typing of plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} in Enterobacteriaceae of animal, environmental and human origin. **Front Microbiol**, v. 5, p. 555, 2014.

ZURFLUH, K.; WANG, J.; *et al.* Vertical transmission of highly similar *bla*_{CTX-M-1}-harbouring IncII plasmids in *Escherichia coli* with different MLST types in the poultry production pyramid. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. SEP, p. 1–7, 2014.

ZURFLUH, K. *et al.* Long-term shedding of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* B2:ST127 by a healthy asymptomatic carrier. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 4, p. 466, 2016.

APÊNDICE

APÊNDICE A. Relação dos *primers* utilizados no presente estudo.

PCR	Alvo	Sequência (5' – 3') ^a	T ^o a	Produto	Referência
REP-PCR	---	IIIGCGCCGICATCAGGC ACGICTTATCAGGCCTAC	40 °C	variável	Vila et al., 1996
MLST	<i>adk</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTCGCGTATTT	54 °C	583 pb	Wirth et al., 2006
	<i>fumC</i>	TCACAGGTGCGCAGCGCTTC GTACGCAGCGAAAAAGATTC		806 pb	
	<i>icd</i>	ATGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA GGACGCAGCAGGATCTGTT		878 pb	
	<i>purA</i>	CGCGTGATGAAAAGAGATGA CATAACGGTAAGCCACGCAGA	60 °C	816 pb	
	<i>gyrB</i>	TCGGCGCACCGGATGACGGC ATCAGGCCTTACACGCATC		911 pb	
	<i>mdh</i>	ATGAAAAGTCGAGTCTCGGCGCTGCTGGCGG TTAACGAACTCTGCCCCAGAGCGATATCTTCTT		932 pb	
	<i>recA</i>	CGCATTGCTTTACCTGACC TCGTCGAAATCTACGGACCGGA		58 °C	
Multiplex CTX-M-grupos	<i>bla</i> _{CTX-M} do grupo 1	TTAGGAARTGTGCCGTGYA CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	60 °C	688 pb	Dallenme et al., 2010
	<i>bla</i> _{CTX-M} do grupo 2	CGTTAACGGCACGATGAC CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		404 pb	
	<i>bla</i> _{CTX-M} do grupo 9	TCAAGCCTGCCGATCTGGT TGATTCTCGCCGCTGAAG		561 pb	
CTX-M-8/25	<i>bla</i> _{CTX-M-8* -25* -26* -39^a -41}	AACRRCRACAGCGCTCTAC TCGAGCCGGAASGTGYAT	60 °C	326 pb	
TEM	<i>bla</i> _{TEM}	ATGAGTATCAACATTTCCG CCAATGCTTAATCAGTGAGG	55 °C	1088 pb	Gaillot et al., 1998
SHV	<i>bla</i> _{SHV}	AGCCGCTTGAGCAAATTTAA GGGGTATCCCGCAGATAAAT	60 °C	800 pb	Taneja et al., 2012
CMY	<i>bla</i> _{CMY-2 e -4}	ATGATGAAAAAATCGTTATGC TTATTGCAGCTTTTCAAGAATGC	55 °C	1200 pb	Mammeri et al., 2010
Ambiente de <i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>ISEp1</i>	AAAATGATTGAAAGGTGGT	50 °C	1100 pb	Liao et al., 2010 Carattoli et al., 2008
	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	CAGCGCTTTGCGGTCTAAG			
CTX-M-8	<i>bla</i> _{CTX-M} -grupo 8	CGGATGATGCTAATGACAAC GTCAGATTGCGAAGCGTC	60 °C	569 pb	Shibata et al., 2006
CTX-M-25	<i>bla</i> _{CTX-M} -grupo 25	CACACGAATTGAAATGTTACG TCACTCCACATGGTGAGT	55 °C	924 pb	Chmelnitsky et al., 2005
CTX-M-2	<i>bla</i> _{CTX-M} -grupo 2	ATGATGACTCAGAGCATTTCG TCAGAAACCGTGGGTTAC	52 °C	876 pb	Bertrand et al., 2006
Ambiente de <i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>ISCR1</i>	CCGTTAAGCTCTTATGTGGG	55 °C	2300 pb	Power et al., 2005
	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	GGCTTCCAGCTGCTGTGCAC		2000 pb	
	<i>sulI</i>	GTATTGCGCCGCTCTTAGAC			
	<i>ISCR1</i>	AAACCAGCATGGTTGGCTAC			
	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	TTAATGATGACTCAGAGCATT		2200 pb	
	3'-CS (<i>qacEΔ1</i>) Região variável do integron	AAACCAGCATGGTTGGCTAC GGCATCCAAGCAGCAAGC AAGCAGACTTGACCTGAT		variável	
	<i>intI1</i>	ACCGCAACTTTCAGCAGCAT GCGTTCGGTCAAGGTTCTGG	900 pb		
Ambiente de <i>bla</i> _{CTX-M-8}	<i>IS10</i> <i>bla</i> _{CTX-M-8}	TCGCTTTGGTTGGCAGGTTACG ACTGGTGTGCACATGGCAAAG	63 °C	600 pb	Presente estudo
Ambiente de <i>bla</i> _{CMY-2}	<i>ISEp1</i> <i>bla</i> _{CMY-2}	AAAAATGATTGAAAGGTGGT TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	50 °C	1026 pb	Saladin et al., 2002 Pérez-Pérez e Hanson, 2002
Grupos filogenéticos	<i>chuA</i>	ATGATCATCGCGCGTGTGCTG AAACGCGCTCGGCCAAT	65 °C	281 pb	Doumith et al., 2012
	<i>yjaA</i>	TGTTTCGCGATCTTGAAGCAAACGT ACCTGTGACAAACCGCCCTCA		216 pb	
	TSPE4.C2	GCGGGTGAGACAGAAACGGC TTGTCGTGAGTTGCGAACCGG		152 pb	
	<i>gadA</i>	GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC		373 pb	

APÊNDICE B (cont...). Perfil de de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentado pelas linhagens de *E. coli* isoladas no Brasil incluídas no estudo.

Fonte ¹	Isolado ²	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm) ³																															
		AMX	AMC	CF	CXM	CTX	XNL	PIP	TIC	TZP	TCC	ETD	CAZ	FOX	FEP	ATM	CEQ	S	K	AN	APR	GM	TM	NET	C	FFC	TE	CS	SSS	TMP	NA	ENR	OFX
		13-21	13-21	11-18	21-22	22-26	17-21	15-20	21-23	16-21	21-24	25-28	20-26	14-22	20-24	20-27	18-22	12-15	14-17	14-17	11-15	15-18	15-18	18-21	18-22	14-19	16-19	14-18	11-17	11-16	14-20	16-22	21-25
Fazenda 1	F37x	6	20	6	6	14	13	8	6	30	21	36	30	30	21	22	16	11	22	26	6	15	9	16	28	29	9	20	6	6	28	38	36
	F42Cx	6	17	6	6	11	11	6	6	28	21	34	26	23	17	20	12	13	24	27	17	27	24	30	28	25	6	20	6	28	6	26	23
	F49Bx	6	24	6	6	12	12	9	6	31	28	35	29	25	21	15	16	21	6	26	18	27	25	30	33	32	7	20	26	34	6	6	7
	F56Ax	6	23	6	6	13	11	9	6	29	24	33	24	27	21	18	16	10	24	26	18	26	24	29	26	28	6	19	24	31	24	33	33
	F58x	6	20	6	6	14	12	8	6	29	22	32	28	27	21	22	16	7	21	26	17	10	18	23	28	28	6	19	6	30	22	33	35
	F59Bx	6	26	6	6	13	11	8	6	31	27	35	23	27	21	17	16	6	19	23	17	9	17	21	31	30	26	19	6	12	14	19	21
	F60Bx	6	26	6	6	15	14	12	6	30	27	35	23	27	23	20	18	11	22	22	16	24	21	25	26	27	6	20	28	36	6	9	9
Fazenda 2	F61Bx	6	19	6	6	13	10	9	6	28	22	33	28	25	19	20	15	6	22	26	6	15	9	15	19	20	6	19	6	28	6	15	16
	F61Cx	6	21	6	6	12	11	8	6	29	26	32	21	23	20	15	15	9	19	25	18	11	18	24	28	28	24	18	6	11	13	16	19
	F66Ax1	6	22	6	6	14	13	11	6	31	25	33	31	28	20	25	16	6	6	28	6	11	8	17	26	28	6	19	6	35	6	7	7
	F66Bx	6	23	6	6	12	13	9	6	28	25	32	20	25	21	17	17	14	22	25	16	25	24	28	26	26	6	19	23	29	6	8	9
	F68Bx	6	17	6	6	10	11	7	6	26	20	31	25	20	17	18	11	12	22	25	18	26	23	28	24	26	6	19	6	27	8	24	22
	F69Ax	6	24	6	6	14	14	11	6	32	25	35	33	27	21	25	16	8	6	29	6	12	7	17	27	29	6	20	6	37	6	9	7
	F71Bx	6	25	6	6	14	14	11	6	30	25	35	25	26	22	20	18	21	24	27	20	26	25	29	26	26	25	19	23	30	24	34	32
	F75x	6	6	6	7	18	14	15	16	22	17	31	10	6	30	18	29	22	23	27	19	29	26	30	23	25	21	19	22	30	26	32	31
	F77Bx	6	6	6	7	13	11	12	17	22	20	29	11	6	29	19	27	23	24	27	18	28	25	31	26	26	22	19	22	33	26	36	34
	F81Bx	7	8	6	15	22	17	19	23	26	23	33	18	7	34	23	32	23	25	28	19	29	26	31	25	25	22	19	21	35	24	31	32
Fazenda 3	F91Ax	6	8	6	7	14	14	14	18	24	6	30	9	6	31	19	29	24	26	29	19	30	27	32	25	25	18	20	21	31	24	32	30
	F94x	6	7	6	8	17	14	14	18	22	6	29	10	7	31	18	30	22	25	27	19	27	25	30	26	26	22	19	26	34	23	32	33
	F106Bx	6	7	6	9	16	14	12	19	25	20	32	14	6	32	23	31	8	6	31	21	32	27	33	29	27	8	21	6	39	29	40	37
	F109x	6	9	6	9	19	17	15	19	21	9	30	14	8	33	19	31	21	24	26	19	26	24	29	23	25	22	19	25	31	23	34	34
	F117Bx	6	9	6	10	19	16	17	21	25	22	32	16	6	32	22	31	23	25	28	18	27	25	31	24	27	21	19	21	34	23	32	32

¹ CRF = carne resfriada de frango.

² Linhagem isolada de CRF lavada com água peptona acrescida de cefotaxima (CFCTX) ou ceftazidima (CFCAZ).

³ AMX = amoxicilina, AMC = amoxicilina/ácido clavulânico, CF = cefalotina, CXM = cefuroxima, CTX = cefotaxima, XNL = ceftiofur, PIP = piperacilina, TIC = ticarcilina, TZP = piperacilina/tazobactam, TCC = ticarcilina/ácido clavulânico, ETD = ertapenem, CAZ = ceftazidima, FOX = cefoxitina, FEP = cefepima, ATM = aztreonam, CEQ = cefquinoma, S = estreptomicina, K = canamicina, AN = amicacina, APR = apramicina, GM = gentamicina, TM = tobramicina, NET = netilmicina, C = cloranfenicol, FFC = florfenicol, TE = tetraciclina, CS = colistina, SSS = sulfonamidas, TMP = trimetoprim, NA = ácido nalidíxico, ENR = enrofloxacin, OFX = ofloxacin. Valores de halo marcados em **vermelho** indicam resistência ao antimicrobiano; valores marcados em **amarelo** indicam resistência intermediária ao antimicrobiano; valores em **verde** indicam sensibilidade.

APÊNDICE C (cont...). Perfil de de susceptibilidade aos antimicrobianos das *E. coli* isoladas de carnes de frango na França incluídas no estudo.

Produtor ¹	Isolado ²	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm) ³																															
		AMX	AMC	CF	CXM	CTX	XNL	PIP	TIC	TZP	TCC	ETD	CAZ	FOX	FEP	ATM	CEQ	S	K	AN	APR	GM	TM	NET	C	FFC	TE	CS	SSS	TMP	NA	ENR	OFX
		13-21	13-21	11-18	21-22	22-26	17-21	15-20	21-23	16-21	21-24	25-28	20-26	14-22	20-24	20-27	18-22	12-15	14-17	14-17	11-15	15-18	15-18	18-21	18-22	14-19	16-19	14-18	11-17	11-16	14-20	16-22	21-25
D	P43A1	6	23	6	6	15	13	11	6	30	20	34	29	26	21	24	16	22	24	27	21	26	24	28	26	27	7	19	6	32	26	35	33
	P43B2	6	19	6	6	13	11	8	6	26	14	29	23	21	17	17	13	6	24	26	21	25	23	28	6	24	6	18	6	6	6	20	18
	P44A1	6	23	6	6	15	12	10	6	31	19	34	29	23	19	22	16	17	24	26	21	26	24	29	27	26	22	18	6	6	9	27	24
	P44B1	6	21	6	6	17	13	10	6	29	18	36	29	28	22	25	17	6	29	32	25	30	27	32	6	27	6	19	6	6	6	23	21
B	P45A1	6	17	6	6	14	11	8	6	25	14	32	23	24	17	16	14	19	6	27	22	27	24	30	26	25	6	19	6	6	6	21	20
	P45B1	6	24	6	6	14	13	9	6	31	20	36	29	25	21	22	16	6	23	26	20	26	24	29	29	29	6	19	6	6	6	21	18
	P45B2	6	22	6	6	16	13	11	6	28	20	35	29	28	22	24	17	6	27	29	24	28	25	31	6	29	6	19	6	6	6	23	21
A	P46B1	6	21	6	6	15	13	10	6	30	20	35	27	23	19	22	16	9	6	26	20	26	23	29	27	27	6	18	6	6	6	8	8
	P47A1	6	26	10	14	22	21	19	6	30	23	37	23	28	29	27	25	22	25	27	22	27	25	29	25	24	24	19	24	30	24	33	32
	P47B1	6	22	6	6	15	13	11	6	30	22	35	28	26	20	23	17	17	23	26	20	26	23	29	29	30	7	18	6	6	27	36	34
C	P48A1	6	20	6	6	13	12	8	6	28	19	34	26	22	19	19	15	18	24	26	21	26	23	30	25	26	22	18	6	6	26	34	32
	P48B1	6	22	6	6	15	12	9	6	28	20	33	27	24	20	21	17	18	25	27	22	27	24	30	26	26	23	19	6	6	23	33	32

¹ “A”, “B”, “C” e “D” indicam os diferentes produtores ou fontes, considerando as carnes vendidas à granel em um mercado específico como um produtor distinto.

² “P” seguido de um número indica o número da amostra de carne de frango analisada no AVB; assim, duas linhagens “Pn^o” indicam que ambas foram obtidas a partir da mesma amostra de carne. “A” indica a carne que foi incubada em BHI sem adição de cefotaxima, e o caldo posteriormente semeado em ágar ChromID[®] ESBL. “B” indica a carne que foi incubada em BHI acrescido com cefotaxima, e o caldo posteriormente semeado em ágar MacConkey acrescido com cefotaxima. O número em seguida de “A” ou “B” indica o número das linhagens isoladas na mesma placa de ágar.

³ AMX = amoxicilina, AMC = amoxicilina/ácido clavulânico, CF = cefalotina, CXM = cefuroxima, CTX = cefotaxima, XNL = ceftiofur, PIP = piperacilina, TIC = ticarcilina, TZP = piperacilina/tazobactam, TCC = ticarcilina/ácido clavulânico, ETD = ertapenem, CAZ = ceftazidima, FOX = cefoxitina, FEP = cefepima, ATM = aztreonam, CEQ = cefquinoma, S = estreptomina, K = canamicina, AN = amicacina, APR = apramicina, GM = gentamicina, TM = tobramicina, NET = netilmicina, C = cloranfenicol, FFC = florfenicol, TE = tetraciclina, CS = colistina, SSS = sulfonamidas, TMP = trimetoprim, NA = ácido nalidíxico, ENR = enrofloxacina, OFX = ofloxacina. Valores de halo marcados em **vermelho** indicam resistência ao antimicrobiano; valores marcados em **amarelo** indicam resistência intermediária ao antimicrobiano; valores em **verde** indicam sensibilidade.

APÊNDICE D. Perfil de de susceptibilidade aos antimicrobianos das *E. coli* isoladas de carnes de coelho da França incluídas no estudo.

Produtor ¹	Isolado ²	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm) ³																															
		AMX	AMC	CF	CXM	CTX	XNL	PIP	TIC	TZP	TCC	ETD	CAZ	FOX	FEP	ATM	CEQ	S	K	AN	APR	GM	TM	NET	C	FFC	TE	CS	SSS	TMP	NA	ENR	OFX
		13-21	13-21	11-18	21-22	22-26	17-21	15-20	21-23	16-21	21-24	25-28	20-26	14-22	20-24	20-27	18-22	12-15	14-17	14-17	11-15	15-18	15-18	18-21	18-22	14-19	16-19	14-18	11-17	11-16	14-20	16-22	21-25
D	L5A1	6	22	6	17	25	22	14	6	30	24	37	18	26	30	14	27	6	25	28	21	30	25	32	10	19	7	21	6	35	6	6	6
D	L7B1	6	23	6	14	20	19	14	6	27	18	35	12	21	27	8	23	22	25	28	23	28	26	31	22	22	21	21	20	25	15	18	18

¹ As duas carnes contaminadas com *E. coli* produtora de ESBL foram obtidas do mesmo produtor.

² “L” seguido de um número indica o número da amostra de carne de coelho analisada no AVB. “A” indica a carne que foi incubada em BHI sem adição de cefotaxima, e o caldo posteriormente semeado em ágar ChromID[®] ESBL. “B” indica a carne que foi incubada em BHI acrescido com cefotaxima, e o caldo posteriormente semeado em ágar MacConkey acrescido com cefotaxima.

³ AMX = amoxicilina, AMC = amoxicilina/ácido clavulânico, CF = cefalotina, CXM = cefuroxima, CTX = cefotaxima, XNL = ceftiofur, PIP = piperacilina, TIC = ticarcilina, TZP = piperacilina/tazobactam, TCC = ticarcilina/ácido clavulânico, ETD = ertapenem, CAZ = ceftazidima, FOX = cefoxitina, FEP = cefepima, ATM = aztreonam, CEQ = cefquinoma, S = estreptomina, K = canamicina, AN = amicacina, APR = apramicina, GM = gentamicina, TM = tobramicina, NET = netilmicina, C = cloranfenicol, FFC = florfenicol, TE = tetraciclina, CS = colistina, SSS = sulfonamidas, TMP = trimetoprim, NA = ácido nalidíxico, ENR = enrofloxacina, OFX = ofloxacina. Valores de halo marcados em **vermelho** indicam resistência ao antimicrobiano; valores marcados em **amarelo** indicam resistência intermediária ao antimicrobiano; valores em **verde** indicam sensibilidade.

APÊNDICE E. TSA, genes *bla* e ambiente genético identificados nas cepas transconjugantes de linhagens do Brasil e da França.

Transconjugante	Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm) ¹																												Gene <i>bla</i>	Plasmídeo ²						
	AMX	AMC	CF	CXM	CTX	XNL	PIP	TIC	TZP	TCC	ETD	CAZ	FOX	FEP	ATM	CEQ	S	K	AN	APR	GM	TM	NET	C	FFC	TE	CS	SSS		TMP	NA	ENR	OFX	Tamanho	Inc	
	13-21	13-21	11-18	21-22	22-26	17-21	15-20	21-23	16-21	21-24	25-28	20-26	14-22	20-24	20-27	18-22	12-15	14-17	14-17	11-15	15-18	15-18	18-21	18-22	14-19	16-19	14-18	11-17		11-16	14-20	16-22	21-25			
CFCTX23 ^{TC}	6	32	8	8	25	21	8	6	34	6	47	36	32	34	35	24	35	35	40	29	41	40	44	35	36	34	28	23	34	26	44	48	CTX-M-8	100 kb	I1	
CFCTX36 ^{TC}	6	25	6	6	13	13	8	6	36	7	39	22	31	27	19	19	30	34	36	30	37	36	39	28	34	30	24	24	35	24	30	29	CTX-M-15	55 kb	X1	
CFCTX57 ^{TC}	6	40	6	6	21	19	10	6	47	25	48	42	33	36	40	24	18	6	40	28	18	27	40	35	40	9	27	27	31	25	40	39	CTX-M-2	242,5 kb	HI/P	
F49Bx ^{TC}	6	40	8	6	18	18	13	6	38	8	44	34	26	31	21	23	32	34	39	30	39	37	43	27	32	31	26	23	32	24	45	46	CTX-M-55	100 kb	N/FII	
F56Ax ^{TC}	6	39	7	6	18	18	12	6	37	7	42	29	32	32	26	26	28	35	36	27	37	35	40	30	33	30	23	24	31	24	47	46	CTX-M-55	110 kb	N/FII	
F59Bx ^{TC}	6	29	6	6	18	17	10	6	35	6	42	29	28	31	25	25	29	34	36	27	36	34	38	30	33	29	24	36	35	21	45	39	CTX-M-55	100 kb	N/FII	
F60Bx ^{TC}	6	61	7	8	17	19	11	6	51	8	36	33	31	34	27	28	30	34	36	27	37	38	40	33	36	29	27	22	34	22	45	45	CTX-M-55	100 kb	N/FII	
F61Cx ^{TC}	6	55	6	6	19	19	13	6	54	8	37	35	33	33	30	25	29	35	38	26	38	36	40	30	34	29	25	22	33	23	36	41	CTX-M-55	100 kb	N/FII	
F66Bx ^{TC}	6	56	6	6	20	18	13	6	56	7	36	35	31	34	28	31	29	33	38	28	39	37	40	34	36	30	27	23	32	23	41	43	CTX-M-55	90 kb	FII	
F71Bx ^{TC}	6	40	6	6	20	18	11	6	37	7	41	33	34	34	28	24	31	35	40	29	40	36	42	31	36	32	26	24	34	24	38	44	CTX-M-55	100 kb	N/FII	
P1A1 ^{TC}	6	40	17	19	32	36	13	6	40	40	40	40	34	40	40	NT	28	38	40	40	39	38	40	25	31	35	25	22	33	20	40	40	TEM-52	---	---	
P1B1 ^{TC}	6	40	6	6	36	29	19	6	40	34	32	32	37	40	36	NT	27	31	29	35	29	28	40	30	34	9	26	6	30	23	38	39	CTX-M-1	---	---	
P19A1 ^{TC}	7	35	17	24	33	40	23	6	36	26	40	32	36	34	34	NT	19	40	40	39	39	40	40	27	40	15	28	6	37	33	37	34	SHV-12	---	---	
P20B1 ^{TC}	12	18	6	26	40	38	32	39	35	40	40	33	27	40	38	NT	30	40	40	39	38	38	40	34	40	40	27	26	31	25	38	40	CMY-2	---	---	
P21A1 ^{TC}	6	35	6	10	32	23	17	6	40	12	40	40	36	34	40	NT	28	35	37	31	38	37	40	32	34	32	24	6	6	26	38	40	CTX-M-1	---	---	
P26A1 ^{TC}	6	32	12	14	35	33	11	6	40	40	40	35	35	40	40	NT	29	32	37	32	34	34	39	25	33	35	25	21	31	21	39	37	TEM-52	---	---	
P31A1 ^{TC}	6	34	12	15	34	31	10	6	40	40	40	36	34	40	40	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	TEM-52	---	---
P31B2 ^{TC}	6	34	13	16	33	36	12	6	40	40	40	37	29	40	40	NT	29	37	40	36	36	39	40	26	34	36	26	25	33	21	36	36	TEM-52	---	---	
P46B1 ^{TC}	6	40	6	6	35	29	19	6	37	20	40	40	39	40	38	NT	27	35	40	32	33	38	40	28	40	10	26	6	31	24	32	38	CTX-M-1	---	---	
P47A1 ^{TC}	6	34	16	18	34	35	15	6	40	40	40	40	31	40	40	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	TEM-52	---	---

¹ AMX = amoxicilina, AMC = amoxicilina/ácido clavulânico, CF = cefalotina, CXM = cefuroxima, CTX = cefotaxima, XNL = ceftiofur, PIP = piperacilina, TIC = ticarcilina, TZP = piperacilina/tazobactam, TCC = ticarcilina/ácido clavulânico, ETD = ertapenem, CAZ = ceftazidima, FOX = cefoxitina, FEP = cefepima, ATM = aztreonam, CEQ = cefquinoma, S = estreptomicina, K = canamicina, AN = ampicilina, APR = apramicina, GM = gentamicina, TM = tobramicina, NET = netilmicina, C = cloranfenicol, FFC = florfenicol, TE = tetraciclina, CS = colistina, SSS = sulfonamidas, TMP = trimetoprim, NA = ácido nalidíxico, ENR = enrofloxacina, OFX = ofloxacina. Valores de halo marcados em **vermelho** indicam resistência ao antimicrobiano; valores marcados em **amarelo** indicam resistência intermediária ao antimicrobiano; valores em **verde** indicam sensibilidade.

² Não foi realizada a caracterização dos plasmídeos das cepas transconjugantes de linhagens da França pois os mesmos já haviam sido identificados nas linhagens selvagens. O TSA e a PCR de gene *bla* foram realizados para confirmar a conjugação.

