

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

TIAGO CASELLA

Detecção e identificação de genes de β -lactamases de espectro estendido em
***Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de carnes de frango, suína e**
bovina destinadas ao consumo humano

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Corrêa Lelles Nogueira
São José do Rio Preto – SP
2012

TIAGO CASELLA

Detecção e identificação de genes de β -lactamases de espectro estendido em *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de carnes de frango, suína e bovina destinadas ao consumo humano

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos, 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.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a. Dr.^a. Mara Corrêa Lelles Nogueira
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman
Universidade de São Paulo

Dr. Fernando Gomes Buchala
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

São José do Rio Preto, 18 de junho de 2012

Casella, Tiago.

Detecção e identificação de genes de β -lactamases de espectro estendido em *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de carnes de frango, suína e bovina destinadas ao consumo humano / Tiago Casella. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

118 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Mara Corrêa Lelles Nogueira

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Enterobactérias. 3. Salmonella. 4. Escherichia coli. 5. Beta-lactamase de espectro estendido. 6. Carnes – Microbiologia. I. Nogueira, Mara Corrêa Lelles. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 579.67

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Rafael Batista Casella Junior e Maria Gislaine Giacomini Casella,
pelo amor, dedicação e, principalmente, confiança de que eu
conquistaria meus sonhos, fazendo dos meus os seus.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e a meus Santos, por guiarem constantemente meus pensamentos e idéias 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 Carolina de Souza Stuchi, pelo seu amor, carinho, apoio e compreensão nos meus necessários momentos de ausência. Você escreveu, e continua marcando, com letras fortemente impressas no meu Livro da Vida.

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!

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

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

À Prof^a. Dr^a. Margarete Teresa Gottardo de Almeida, pelas sábias palavras em momentos que se fizeram necessárias e de grande ajuda.

À Juliana Tiemi Takahashi, por sua grande contribuição neste trabalho, sempre com muita paciência, atenção e companheirismo.

Às também colaboradoras Mayra Mioto Mataruco e Simone Quintão Silva, que, com placidez e generosidade, auxiliaram em diversas etapas do projeto.

À amiga Milena Polotto, por seus tão valiosos ensinamentos e sinceridade, minha eterna “Chefinha”, agradeço por grande parte do que hoje sei!

À Tatiana Elias Colombo, por sua infinita disponibilidade em auxiliar nos sequenciamentos dos genes.

Aos professores da Pós-Graduação, por contribuírem nobremente para o meu enriquecimento intelectual acadêmico.

Aos amigos-irmãos do coração, Jão, Nana e Tiaguinho, pela amizade e pelos incontáveis momentos de alegria e descontração. Minha eterna amizade e entrega a vocês!

Aos colegas de laboratório da FAMERP, que passaram ou ficaram, Adriano, Alessandra, Amanda, Ana Thereza, Aninha, Arieli, Carol, Daiane, Danila, Danilo, Eliane, Fernanda, Gislaine, Guilherme, Guitto, Kátia, Keith, Lígia, Luana, Lucely, Luciângela, Mônica, Raphael, Sílvia e Vinicius, pela agradável companhia e presença nos momentos divertidos durante a execução deste trabalho. Obrigado por me aguentarem!

Aos amigos Bruna, DaniA, DaniE, Denise, Diego, Elô, Gabi, Jaque, Julia, Leandro, Letícia, Luana e Pedro, pelas incontáveis e impagáveis situações de companheirismo, emoções e risos. Vocês também foram essenciais. Muito obrigado!

À empresa Cobb-Vantress Brasil, unidade de Guapiaçú, por auxiliar na identificação das cepas de *Salmonella*, e ao Leonardo Sestak, gerente de laboratório e sanidade, por sua atenção e auxílio sempre que requisitado.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação e da Biblioteca do IBILCE/UNESP, que sempre orientaram com paciência os passos a serem tomados.

À UNESP, pela formação que trago desde a Graduação.

À FAMERP, pelo espaço amplamente utilizado durante o desenvolvimento do projeto.

Agradeço, por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo imprescindível apoio financeiro.

RESUMO

A ampla utilização de drogas antimicrobianas tem resultado em aumento e disseminação da resistência aos antimicrobianos entre bactérias patogênicas para o homem. Além do uso indiscriminado em humanos, estas drogas também são extensivamente utilizadas em medicina veterinária e no manejo de animais para a produção de alimentos, o que é reconhecido como um fator associado ao desenvolvimento da resistência em bactérias patogênicas ou comensais de animais. Evidências microbiológicas e clínicas reforçam a associação entre o uso de antimicrobianos na produção animal e o aumento da prevalência de bactérias resistentes na população humana. Sendo assim, a regulamentação da utilização de antimicrobianos no manejo de animais de produção e na terapêutica veterinária é de grande interesse para o Brasil, pois envolve além de importantes aspectos de saúde pública, questões comerciais, pois o país é um dos maiores exportadores de carnes do mundo. Neste estudo, foram analisadas amostras de carnes bovina, suína e de frango, visando à detecção de *Salmonella* e *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs). Os isolados bacterianos, obtidos de novembro de 2010 a agosto de 2011, foram submetidos ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, e 34 cepas foram submetidas à PCR para detecção dos genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}. A presença de genes de ESBLs foi confirmada em seis isolados, sendo *bla*_{CTX-M-2} detectado em uma cepa de *Proteus mirabilis*, uma *Klebsiella pneumoniae*, uma *Citrobacter diversus* e duas *E. coli*. O gene *bla*_{SHV-2} foi detectado em uma cepa de *K. pneumoniae*. A caracterização do ambiente genético de *bla*_{CTX-M-2} indicou a presença de integrons de classe 1 em todas as cepas, exceto *C. diversus*. Todos os *bla*_{CTX-M-2} foram detectados em cepas isoladas de amostras de carne suína. A presença de outras Enterobacteriaceae multirresistentes e carreadoras de genes de ESBLs em carnes pode constituir um risco para a saúde humana.

Palavras-chave: β -lactamases de espectro estendido; Enterobacteriaceae; Carne.

ABSTRACT

The wide use of antimicrobial drug has resulted in increase and spread of antimicrobial resistance among pathogenic bacteria for humans. In addition, these drugs are extensively used in veterinary and agriculture for food production, which is recognized as a factor associated with the development of resistance in pathogenic or commensal bacteria of animals. Microbiological and clinical evidence strengthen the association between use of antimicrobials in animal production and the increasing prevalence of resistant bacteria in the human population. Thus, regulation of the use of antimicrobials in the management of livestock and veterinary therapy has great interest for Brazil, because it involves, in addition to important public health issues, trade issues, as the country is one of the largest exporters of beef in the world. In this study, we analyzed samples of beef, pork and chicken meat, focusing on the detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBLs)-producing *Salmonella* and *Escherichia coli*. The bacterial isolates, obtained from November, 2010, to August, 2011, were tested for antimicrobial susceptibility, and 34 strains were tested by PCR for detection of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES}, *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM} genes. The presence of ESBLs genes was confirmed in six isolates, being *bla*_{CTX-M-2} detected in a strain of *Proteus mirabilis*, one *Klebsiella pneumoniae*, one *Citrobacter diversus* and two *E. coli*. The *bla*_{SHV-2} gene was detected in a *K. pneumoniae* strain. The characterization of the genetic environment of *bla*_{CTX-M-2} indicated the presence of a class 1 integron in all strains, except *C. diversus*. All *bla*_{CTX-M-2} were detected in strains isolated from pork samples. The presence of other multidrug-resistant Enterobacteriaceae carrying ESBLs genes in meat samples may represent a risk to human health.

Keywords: extended-spectrum β -lactamase; Enterobacteriaceae; Meat samples.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Características bioquímicas das cepas em ágar isoladas no estudo.....	49
Figura 2 – Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene <i>bla</i> _{SHV}	64
Figura 3 – Gel de eletroforese da multiplex-PCR para detecção dos genes <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{CTX-M}	64
Figura 4 – Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene <i>bla</i> _{GES}	66
Figura 5 – Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene <i>bla</i> _{TEM}	68
Figura 6 – Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene <i>bla</i> _{CTX-M}	70
Figura 7 – Gel de eletroforese da RFLP para detecção do grupo do gene <i>bla</i> _{CTX-M} nas cepas indicadas.....	70
Figura 8 – Gel de eletroforese da PCR para detecção do integron de classe 1.....	72
Figura 9 – Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene das integrases dos integrons de classe 1, 2 e 3.....	73
Figura 10 – Gel de eletroforese da PCR para amplificação da região codificadora de cassetes gênicos do integron de classe 1 nas cepas que possuem o gene <i>bla</i> _{CTX-M-2}	75
Figura 11 – Esquema da estrutura concebida para o integron de classe 1 na definição dos pares de <i>primers</i> utilizados para caracterizar o ambiente genético dos genes <i>bla</i> _{CTX-M-2} possivelmente inseridos nesse tipo de estrutura.....	76
Figura 12 – Gel de eletroforese da PCR para caracterização do integron de classe 1 nas cepas que apresentaram <i>bla</i> _{CTX-M-2} com o “Par 1” de <i>primers</i> da Tabela 3.....	76
Figura 13 – Gel de eletroforese da PCR para caracterização do integron de classe 1 nas cepas que apresentaram <i>bla</i> _{CTX-M-2} com o “Par 2” de <i>primers</i> da Tabela 3.....	78
Figura 14 – Gel de eletroforese da PCR para caracterização do integron de classe 1 nas cepas que apresentaram <i>bla</i> _{CTX-M-2} com o “Par 3” de <i>primers</i> da Tabela 3.....	79
Figura 15 – Gel de eletroforese da PCR para caracterização do integron de classe 1 nas cepas que apresentaram <i>bla</i> _{CTX-M-2} com o “Par 4” de <i>primers</i> da Tabela 3.....	80
Figura 16 – Gel de eletroforese da PCR para caracterização do integron de classe 1 nas cepas que apresentaram <i>bla</i> _{CTX-M-2} com o “Par 5” de <i>primers</i> da Tabela 3.....	81
Figura 17 – Dendrograma das sete cepas de <i>Salmonella</i> isoladas a partir de CRS.....	83
Figura 18 – Dendrograma dos isolados recuperados a partir de CRB, com os quais foi possível realizar a tipagem molecular.....	84

Figura 19 – Dendrograma dos isolados recuperados a partir de CRS, com os quais foi possível realizar a tipagem molecular, não estando apresentados os isolados identificados como <i>Salmonella</i>	84
Figura 20 – Dendrograma dos isolados recuperados a partir de CRF, com os quais foi possível realizar a tipagem molecular.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Primers</i> utilizados nas PCR de detecção e ERIC-PCR.....	39
Tabela 2 – Padrões de restrição gerados pelas endonucleases nos genes codificadores de CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-8.....	41
Tabela 3 – <i>Primers</i> utilizados para as reações de sequenciamento de genes <i>bla</i>	44
Tabela 4 – Pares de <i>primers</i> utilizados nas PCR e sequenciamento de nucleotídeos para a caracterização do ambiente genético de <i>bla</i> _{CTX-M}	45
Tabela 5 – Comparação da quantidade de cepas isoladas por tipo de carne.....	51
Tabela 6 – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.....	52-62
Tabela 7 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene <i>bla</i> _{SHV}	65
Tabela 8 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene <i>bla</i> _{GES}	67
Tabela 9 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene <i>bla</i> _{TEM}	69
Tabela 10 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene <i>bla</i> _{CTX-M}	71
Tabela 11 – Comparação entre os tamanhos das bandas das eletroforeses com os dois pares de <i>primers</i> , mostradas nas Figuras 10 e 15, nas cepas que apresentam integron.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AK – amicacina

AMC – amoxicilina/ácido clavulânico

ATCC – “American Type Culture Collection”

ATM – aztreonam

CAZ – ceftazidima

CLSI – “Clinical Laboratory Standards Institute”

CN – gentamicina

CRB – carne resfriada bovina

CRF – carne resfriada de frango

CRO – ceftriaxona

CRS – carne resfriada suína

CTX – cefotaxima

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – “Desoxynucleoside Triphosphate”

EFT – ceftiofur

ENO – enrofloxacin

ETP – ertapenem

FEP – cefepim

FOX – cefoxitina

IPM – imipenem

KF – cefalotina

LEV – levofloxacin

MXF – moxifloxacin

NA - ácido nalidixico

OFX – ofloxacin

orf – “open reading frame”

q.s.p. – quantidade suficiente para

SAM – ampicilina/sulbactam

TOB – tobramicina

TZP – piperacilina/tazobactam

LISTA DE SÍMBOLOS

G – força gravitacional

g – gramas

°C – graus Celsius

kb – kilobases

μg – microgramas

μL – microlitros

mL – mililitros

pb – pares de base

pmol – picomol

rpm – rotações por minuto

U – unidade

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
1.1 Utilização de Antimicrobianos na Produção Animal e Medicina Veterinária	17
1.2 <i>Salmonella</i> spp. e <i>Escherichia coli</i> : Importância em Saúde Humana e Animal	18
1.3 Resistência de <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> spp. aos β -Lactâmicos.....	21
1.4 Disseminação de <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> spp. Produtoras de ESBLs	23
1.5 Principais β -Lactamases Detectadas em <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> spp.	24
1.5.1 CTX-M.....	25
1.5.2 TEM e SHV	27
1.5.3 PER , VEB e GES.....	28
1.5.4 OXA.....	30
1.5.5 KPC.....	31
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos Específicos.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Isolamento, Identificação e Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos das Cepas do Estudo.....	35
3.2 Estudos Moleculares	37
3.2.1 Extração do DNA genômico.....	37
3.2.2 Testes com a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional	38
3.2.3 Multiplex-PCR.....	40
3.2.4 Purificação dos “amplicons”	41
3.2.5 Agrupamento dos genes <i>bla</i> _{CTX-M} por RFLP	41
3.2.6 Identificação de <i>Salmonella</i> através da técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) ...	42
3.2.7 Sequenciamento dos genes <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{CTX-M}	43
3.2.8 Caracterização do ambiente genético de <i>bla</i> _{CTX-M}	45
3.2.9 Tipagem molecular	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Resultados Microbiológicos.....	48
4.1.1 Estudo Piloto.....	48
4.1.2 Detecção de <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> nas amostras de carnes de frango, suína e bovina.....	48
4.1.3 Suscetibilidade aos antimicrobianos	50
4.2 Resultados Moleculares	63
4.2.1 Genes de resistência aos β -lactâmicos	63
4.2.1.1 Detecção e caracterização de <i>bla</i> _{SHV}	63
4.2.1.2 Detecção e caracterização de <i>bla</i> _{GES}	66
4.2.1.3 Detecção e caracterização de <i>bla</i> _{TEM}	67
4.2.1.4 Detecção e caracterização de <i>bla</i> _{CTX-M}	69
4.2.2 Testes para detecção e caracterização dos integrons	72
4.2.3 Tipagem molecular	82
5 CONCLUSÕES	88
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nos últimos sessenta anos, descritos como a era dos antimicrobianos, surgiu uma grande diversidade de drogas antimicrobianas que alteraram a história da medicina, permitindo o tratamento de infecções antes fatais para seres humanos. Infelizmente, os benefícios trazidos por estas drogas foram acompanhados pelo surgimento da resistência aos antimicrobianos em várias espécies de bactérias patogênicas (MOELLERING, 1998). Atualmente, o tratamento das infecções bacterianas é frequentemente uma tarefa complicada devido ao aparecimento e à constante evolução das bactérias resistentes aos antimicrobianos disponíveis comercialmente (ALEKSHUM & LEVY, 2004; SLAMA, 2008), o que resulta em maiores períodos de internação e aumento das taxas de mortalidade e dos custos da assistência à saúde (PITOUT, 2008; TALBOT et al., 2006). Apesar desta realidade, a indústria farmacêutica tem reduzido drasticamente os investimentos no desenvolvimento de novas drogas (TALBOT et al., 2006), e a resistência aos antimicrobianos é hoje um dos maiores problemas de saúde pública no mundo.

Historicamente, bactérias multirresistentes foram descritas como um problema exclusivo em hospitais. Entretanto, nos últimos vinte anos, aumentaram os relatos de infecções causadas por essas bactérias em pacientes atendidos em outros serviços de saúde, como centros de hemodiálise e casas de repouso. Mais recentemente, bactérias multirresistentes tornaram-se um importante problema na comunidade, afetando pessoas com limitado ou nenhum contato com instituições de assistência à saúde (CHEN et al., 2009).

O aumento e a disseminação da resistência entre bactérias patogênicas para o homem são vistos, atualmente, como consequências da ampla utilização de drogas antimicrobianas, que exercem pressão seletiva sobre bactérias com mecanismos de resistência naturais ou adquiridos (STRUELENS, 1998). De fato, o uso indiscriminado de antimicrobianos em saúde humana, incluindo o excesso de prescrições, a administração de drogas ou de doses inadequadas e a duração insuficiente do tratamento, é reconhecido como fator que contribui para a disseminação e o constante aumento das taxas de resistência (WHO, 2001).

Além do uso indiscriminado em humanos, drogas antimicrobianas também são extensivamente utilizadas em medicina veterinária e no manejo de animais para produção de alimentos, o que é reconhecido como um fator associado ao desenvolvimento da resistência em bactérias patogênicas ou comensais de animais (CORNELI, 2004; PRICE, 2007). Nestas atividades, os antimicrobianos são utilizados para o tratamento de doenças infecciosas de várias etiologias e profilaxia contra agentes causadores de diarreia, e também como

promotores de crescimento, visando maior rendimento da cadeia produtiva de carnes por aumentarem a eficiência da conversão alimentar, o ganho de peso e a uniformidade dos lotes (AARESTRUP, 2006).

Cepas de várias espécies bacterianas apresentando resistência a diversos antimicrobianos têm sido isoladas de carnes de animais de produção, como aves, suínos e bovinos (CARATTOLI, 2008), demonstrando a importância destes animais como reservatórios de genes de resistência. Evidências microbiológicas acumuladas até o momento mostram a relação do uso de antimicrobianos na produção animal e o aumento da prevalência de bactérias resistentes na população humana. A colonização do trato gastrointestinal de humanos por bactérias resistentes a antimicrobianos comensais desses animais e a ocorrência de infecções por estas bactérias adquiridas via cadeia alimentar são descritas na literatura (BOERLIN & REID-SMITH, 2008).

Sendo assim, diversos países têm procurado regulamentar a utilização de antimicrobianos no manejo de animais de produção e na terapêutica veterinária. Em 2002, a APUA (“Alliance for the Prudent Use of Antibiotics”) recomendou que todos os países tornassem disponíveis ao domínio público os dados quantitativos do uso de antimicrobianos na medicina humana, veterinária e na agricultura. Além disso, é recomendado que i) antimicrobianos sejam usados apenas para o tratamento de doenças, ii) que sejam administrados para animais somente com prescrição veterinária, iii) que agências reguladoras de todos os países considerem dados sobre a ecologia da resistência aos antimicrobianos ao avaliar o risco para a saúde humana provocado pela utilização de antimicrobianos na agricultura e medicina veterinária, e iv) que programas de pesquisa da resistência antimicrobiana sejam expandidos (FAAIR SCIENTIFIC ADVISORY PANEL, 2002). A adesão a estas práticas é de grande interesse para o Brasil, pois, além dos importantes aspectos de saúde pública, envolve questões comerciais, já que o país é um dos maiores exportadores de carnes do mundo (SPINOSA, 2002). Ainda, a União Européia já impõe restrições à importação de produtos de origem animal originados de países que utilizam antimicrobianos como promotores de crescimento (FARIA et al., 2009).

No Brasil, existem poucos estudos sobre a ocorrência e prevalência dos principais mecanismos de resistência a drogas antimicrobianas em bactérias causadoras de zoonoses. Dados da literatura, embora escassos, mostram a ocorrência de cepas resistentes em carnes de aves e suínos analisados no país e relatam a extensa utilização de antimicrobianos para a promoção do crescimento (FRACALANZZA et al., 2007; MEDEIROS et al., 2011; PESSANHA & GONTIJO FILHO, 2001), apesar da regulamentação desta prática pelo

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, através de diversas portarias que regulamentam a utilização de determinados antimicrobianos. Dentre essas portarias, citam-se a Portaria nº 159/92, que proíbe o uso de Clortetraciclina e Oxitetraciclina como promotores de crescimento, e as Portarias nº 259/92 e nº 448/98, que proíbem o uso do Cloranfenicol e do nitrofurano Furazolidona na alimentação animal, respectivamente (BRUMANO & GATTÁS, 2009). Muitas agroindústrias acatam adicionalmente proibições que vigoram em outros países para atender os mercados internacionais. Um exemplo é a suspensão voluntária da bacitracina de Zn, tilosina, virginiamicina e espiamicina que algumas empresas brasileiras realizaram devido à proibição na Comunidade Européia em 1998 (SONCINI, 1999).

As carnes são os principais alimentos responsáveis pela veiculação de patógenos ao homem, devido às suas características ideais para a multiplicação bacteriana (ICMSF, 2005). *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* foram selecionadas para este estudo porque são patógenos com extensa casuística de associação em surtos ou casos isolados de infecções adquiridas através do consumo de alimentos de origem animal (MEAD et al., 1999; VOETSCH et al., 2004, WHICHARD et al., 2010), e estão entre os principais patógenos veiculados por produtos cárneos (ICMSF, 2005; RHOADES et al., 2009). Na última década, a aquisição de genes de resistência a drogas β -lactâmicas tanto por *Salmonella* quanto por *E. coli* tem sido relatada na literatura (CARATTOLI, 2008). Este fato é preocupante porque tais drogas são a principal opção terapêutica para o tratamento de infecções por estes patógenos.

Considerando-se que *Salmonella* e *Escherichia coli* são patógenos adquiridos também em virtude do consumo e do contato com carnes, e que *E. coli* é reconhecida como um importante veículo para a disseminação de genes de resistência entre populações bacterianas de animais e humanos (O'BRIEN, 2002; SCHJØRRING et al., 2008), a investigação da presença destes poderá auxiliar na execução de programas de segurança alimentar que avaliem o risco de aquisição de cepas bacterianas resistentes por meio da alimentação, auxiliando na contenção da emergência e evolução da resistência.

1.1 Utilização de Antimicrobianos na Produção Animal e Medicina Veterinária

Os antimicrobianos são utilizados na produção animal para profilaxia e tratamento de diversas doenças infecciosas, além do uso para a promoção do crescimento (PRESCOTT, 2008). No último caso, podem ser adicionados na alimentação, em doses subterapêuticas, com a finalidade de prevenir, reduzir ou controlar microrganismos prejudiciais ao processo

digestivo, melhorando a eficiência da conversão alimentar e o crescimento (BUTOLO, 1999; BUTOLO, 2002).

Atualmente, a utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento é uma prática condenada em vários países, pois vários estudos relatam a relação entre a utilização de doses subterapêuticas de antimicrobianos e o desenvolvimento da resistência. A União Européia restringe esta prática desde 2006; nos EUA, existe uma grande pressão para a eliminação desta prática (ROE & PILLAI, 2003); e no Brasil, várias portarias regulamentam a prática visando manter a exportação de carne para países da União Européia e outros (BRUMANO & GATTÁS, 2009).

Apesar das políticas de redução da utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento, a sua utilização em medicina veterinária tem aumentado drasticamente, assim como os relatos de resistência em espécies bacterianas patogênicas ou comensais de animais de produção e domésticos (SOULSBY, 2007). Na terapêutica veterinária, diversos grupos de antimicrobianos são utilizados; dentre eles, destacam-se os β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), aminoglicosídeos, macrolídeos, sulfonamidas, tetraciclina e quinolonas (GOMES, 2004; PRESCOTT, 2008, SMET et al., 2009).

O β -lactâmico Ceftiofur, amplamente utilizado no tratamento de doenças infecciosas em aves, é análogo ao β -lactâmico Cefotaxima, utilizado no tratamento clínico humano. Outro exemplo é a fluoroquinolona Enrofloxacin, utilizada de maneira profilática em animais, cujo antimicrobiano análogo Ciprofloxacina tem grande importância no tratamento de infecções em humanos. Assim, a presença, em animais, de bactérias que possuem genes de resistência a antimicrobianos caracteriza risco à saúde humana, já que esses genes podem ser transferidos a patógenos humanos, dificultando o tratamento da infecção.

1.2 *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*: Importância em Saúde Humana e Animal

Salmonella spp. e *Escherichia coli* são membros da família Enterobacteriaceae, que constitui a maior e mais heterogênea família de bactérias Gram-negativas de importância clínica (DENTON, 2007; FORBES, 1998). São bacilos não formadores de esporos, com motilidade variável, oxidase negativos, anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose com ou sem produção de gás, catalase positivos, que reduzem nitrato a nitrito e crescem em meios básicos, ricos e seletivos (FARMER, 1999).

A maioria das Enterobacteriaceae é encontrada no trato gastrointestinal de humanos e animais, na água, solo e vegetais (FARMER, 1991). Algumas são consideradas

enteropatógenos por causarem, preferencialmente, infecções gastrintestinais, como os diversos sorotipos de *Salmonella enterica* e de *Escherichia coli*. Podem, também, causar infecções em outros sítios corpóreos, sendo responsáveis por cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias (BRASIL, 2004).

Salmonella é uma Enterobacteriaceae amplamente disseminada na natureza e que possui, como principais reservatórios, os animais e o homem. O gênero consiste de duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* inclui seis subespécies (*S. enterica enterica*, *S. enterica salamae*, *S. enterica arizonae*, *S. enterica diarizonae*, *S. enterica houtenae* e *S. enterica indica*). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* possui 1531 sorotipos, dentre eles os mais comuns causadores de doença em humanos (GRIMONT & WEILL, 2007).

Até meados dos anos 1980, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhi era considerado o principal causador de infecção em humanos (D'AOUST, 1989), sendo a maioria dos casos causados pelo consumo de água contaminada, com raras descrições de ocorrências causadas por alimentos. *Salmonella* Typhi é o agente etiológico da febre tifóide, uma infecção sistêmica. Esse sorotipo tem como único hospedeiro o homem, e assim, a transmissão depende do contato entre humanos ou de veículos alimentares contaminados com fezes humanas (FOLEY & LYNNE, 2008).

Posteriormente, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis emergiu como o mais importante agente causador de salmonelose em todo o mundo (ANDREATTI FILHO, 2006). Além de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium também é um importante patógeno humano, sendo um sorotipo extremamente invasivo (BARROW, 1995).

A pandemia de *Salmonella* Enteritidis é atribuída, principalmente, à transmissão transovariana da bactéria entre aves de granja (EUA, 1998). Também está associada à globalização da economia, com a grande movimentação de alimentos e animais de produção através do mundo e o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos. A grande frequência de detecção de *Salmonella enterica* em carnes deve-se, principalmente, à contaminação da carcaça do animal com o conteúdo intestinal durante o processamento (MATSUBARA, 2005; SNOEYENBOS & WILLIAMS, 1991), e a maioria dos casos de infecção causados por esta bactéria se deve ao manuseio e/ou ao cozimento inadequado dos alimentos (TODD, 1997), sendo que os de origem animal são os principais, mas não os únicos, envolvidos em surtos de infecção.

Somente nos EUA, onde existe um eficiente sistema de notificação de infecções alimentares, ocorrem anualmente cerca de 1,4 milhões de casos de salmonelose, resultando

em 17.000 hospitalizações e mais de 500 mortes (MEAD et al., 1999; VOETSCH et al., 2004). Acompanhando a pandemia de *Salmonella* Enteritidis, foi verificado um aumento significativo no isolamento desse sorotipo no Estado de São Paulo a partir de 1993 (TAVECHIO et al., 1996).

As infecções por *Salmonella* Enteritidis em humanos podem variar desde o estado de portador assintomático até manifestações clínicas, que variam entre infecções locais, tal como a gastroenterite, até septicemia. A gastroenterite, caracterizada por diarreia, cólicas abdominais e febre, é a forma mais comum, benigna, e autolimitada de salmonelose. Em uma pequena porcentagem dos casos, a septicemia e a infecção invasiva de órgãos e tecidos podem ocorrer, causando osteomielite, pneumonia e meningite (COHEN et al., 1987).

Em aves, infecções por *Salmonella* Enteritidis com sinais clínicos e mortalidade afetam, principalmente, animais jovens ou submetidos a condições de estresse (BERCHIERI JÚNIOR, 2000; FERREIRA et al., 1990). Em aves adultas, as infecções são geralmente assintomáticas, mas pode ocorrer queda na produção de ovos em função de alterações do ovário, mortalidade embrionária e mortalidade em aves recém-nascidas (GAST, 1997).

Escherichia coli é a espécie predominante entre todas as Enterobacteriaceae encontradas no trato gastrointestinal humano e de animais, sendo que vários sorotipos são comensais. Como parte da microbiota normal, traz benefícios ao hospedeiro por impedir a colonização por bactérias patogênicas, sintetizar ácidos graxos, vitaminas K e do complexo B (DRASAR & HILL, 1974). Entretanto, sorotipos diarreiogênicos podem provocar infecções em humanos. As *E. coli* diarreiogênicas estão distribuídas em seis grupos, com base em seus fatores de virulência e características fenotípicas, sendo denominadas: enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasoras (EIEC), enteroagregativas (EAggEC), *E. coli* com padrão de aderência difuso (DAEC), e *E. coli* produtoras de toxina de Shiga (STEC). As infecções em humanos adquiridas através do consumo de alimentos contaminados geralmente envolvem STEC e, com menos frequência, EPEC, ETEC e EAggEC (NEWELL et al., 2010).

Considerando-se que *E. coli* faz parte da microbiota intestinal normal, e entre as bactérias de habitat reconhecidamente fecal, é a mais comum (EVANGELISTA, 2001), sua presença em alimentos indica falhas na higiene e contaminação de origem fecal, sendo que elevadas contagens podem estar relacionadas à presença significativa de outras espécies de enteropatógenos, como *Salmonella* spp. (EISEL et al., 1997; GILL et al., 1996; JAY, 2000). Em bovinos, *E. coli* de sorotipos patogênicos para o ser humano são encontrados como comensais, como a *E. coli* O157:H7, uma cepa produtora de toxina de Shiga (STEC)

(PRUIMBOOM-BRESS et al., 2000). Silveira e colaboradores (1999) analisaram a ocorrência de *E. coli* O157:H7 em hambúrgueres produzidos no Brasil, revelando que em 1,9% dos produtos analisados foi detectado o sorotipo O157 (SILVEIRA et al., 1999). Um estudo realizado por Franco e Mantilla (2004) mostrou altos índices de contaminação em cortes de carne bovina com EPEC e EIEC. Esses sorotipos também foram encontrados em coxas de frango (LEITE & FRANCO, 2006). No estudo de Cook e colaboradores (2012), foram encontradas STEC em 1% dos peitos de frango analisados no Canadá (COOK et al., 2012).

1.3 Resistência de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. aos β -Lactâmicos

As drogas β -lactamâmicas, como penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, estão entre as mais prescritas em todo o mundo, apesar da crescente resistência observada entre as diversas espécies de patógenos bacterianos (SMET et al., 2009). Pertencem a uma família de antimicrobianos com atividade antibacteriana que se caracteriza por possuir um anel β -lactâmico ligado a um anel de tiazolidina e, ainda, uma cadeia lateral variável (FONZÉ, 1995). A integridade do anel β -lactâmico é imprescindível à sua atividade, que consiste em inativar um conjunto de transpeptidases que catalisam ligações cruzadas na fase final de síntese do peptidoglicano. A hidrólise do anel β -lactâmico implica na inativação do antimicrobiano (SOUSA, 2000).

Entre as bactérias Gram-negativas, a produção de β -lactamases é o principal mecanismo de resistência às drogas β -lactâmicas (MEDEIROS & CRELLIN, 1997). As β -lactamases são enzimas que hidrolisam os antimicrobianos β -lactamâmicos pela hidroxilação irreversível da ligação amida do anel β -lactâmico, gerando compostos sem atividade antimicrobiana (BUSH, 2001). β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) apresentam a capacidade de hidrolisar as penicilinas, todas as cefalosporinas, e o aztreonam (BERTRAND et al., 2006; PATERSON & BONOMO, 2005), e representam um importante problema de saúde pública, pois bactérias produtoras de ESBL são a maior causa de falha terapêutica com cefalosporinas (BRADFORD, 2001; BUSH, 2001).

Dois esquemas são comumente utilizados na classificação das β -lactamases: a classificação molecular de Ambler (AMBLER, 1980; AMBLER et al., 1991) e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH et al., 1995). A classificação molecular de Ambler baseia-se na homologia de aminoácidos entre as enzimas, e reconhece quatro classes, designadas de A a D. As classes A, C e D são enzimas que contêm o aminoácido serina em seu sítio ativo; a classe B é representada pelas metaloenzimas, contendo zinco no sítio ativo.

A classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros baseia-se na similaridade entre os perfis de substratos e inibidores das β -lactamases, sendo considerada de maior utilidade em estudos microbiológicos. Entretanto, atualmente, utiliza-se a combinação das características estruturais e funcionais das β -lactamases (GISKE et al., 2009).

A maioria das ESBLs pertencem ao grupo A de Ambler e ao grupo 2 de Bush-Jacoby-Medeiros. A primeira ESBL foi descrita em 1983 (KNOTHE et al., 1983), após a introdução das cefalosporinas de terceira geração para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gram-negativas produtoras de β -lactamases de espectro restrito (PATERSON & BONOMO, 2005). De acordo com a última atualização do *site* da Lahey Clinic, que é a referência para a consulta sobre a diversidade de β -lactamases descritas, existem até o presente mais de 781 tipos de β -lactamases, distribuídas entre os tipos TEM, SHV, CTX-M, OXA, GES, PER, VEB e KPC (JACOBY & BUSH, 2012). As ESBLs tipo SHV, TEM e CTX-M são mais comumente encontradas em membros da família Enterobacteriaceae, sendo que, atualmente, as CTX-M são as mais frequentemente encontradas entre isolados clínicos humanos de origem hospitalar e comunitária (BAUERNFEID et al., 1990; BONNET, 2004; ROMERO et al., 2005). Além destas, a frequência de isolamento de GES, PER e VEB tem aumentado, e a produção destas enzimas por bactérias Gram-negativas tem se tornado um problema emergente (NAAS et al., 2008).

O aumento da produção de ESBLs por Enterobacteriaceae isoladas de animais começou a ser detectado a partir do ano 2000, cerca de dez anos após o crescimento da detecção de ESBLs em cepas isoladas de humanos, observado no início dos anos 1990 (ARLET et al., 2006; BERTRAND et al., 2006; CARATTOLI, 2008; CLOECKAERT et al., 2007; JACOBY, 2009; SMET et al., 2009; LI et al., 2007; PATERSON & BONOMO, 2005; PITOUT & LAUPLAND, 2008; WALSH et al., 2008). Atualmente, bactérias produtoras de ESBLs têm sido frequentemente isoladas de animais de produção, o que pode caracterizar um risco para a saúde humana, já que estas podem colonizar ou provocar doenças em humanos, além de servir como reservatórios de genes de ESBLs que transitam entre humanos e animais (SMET et al., 2009). Além disso, em patógenos multirresistentes, a produção de ESBLs está frequentemente associada à resistência a outros antimicrobianos, como aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina e sulfas (CORNAGLIA et al., 2008).

Dados do “Retail Meat Surveillance at the U.S.”, coordenado pelo “National Antimicrobial Resistance Monitoring System” (NARMS), mostraram cepas de *E. coli* com altas taxas de resistência aos antimicrobianos comumente utilizados na prática veterinária em amostras de carnes adquiridas comercialmente (EUA, 2006). A presença de *Salmonella*

Typhimurium multirresistente em gado, suínos e aves foi demonstrada por Wedel e colaboradores (2005).

Um estudo publicado nos EUA, em 2006, mostrou um aumento na resistência aos antimicrobianos de diversas classes em *Salmonella* isoladas de animais, e o aumento drástico da resistência às cefalosporinas no período entre 2005 e 2006 (EUA, 2006). Este resultado é preocupante, pois a cefotaxima, uma cefalosporina de terceira geração, é uma importante droga para o tratamento de salmonelose em crianças (RABSCH et al., 2001). Além disso, o isolamento de cepas de *Salmonella* multirresistentes a partir de animais de produção é o indicador de maior magnitude de disseminação dos mecanismos de resistência entre outras enterobactérias comensais ou patogênicas, como por exemplo, as *E. coli*, que estão submetidas aos mesmos mecanismos de seleção e existem em uma população muito maior no trato gastrointestinal tanto de humanos quanto de animais (O'BRIEN, 2002).

1.4 Disseminação de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Produtoras de ESBLs

A maioria dos sorotipos de *Salmonella* é comensal em aves, importante fonte desses patógenos para humanos. Nestes animais, cepas multirresistentes de *Salmonella* de vários sorotipos têm sido detectadas (GYLES, 2008; ZHAO et al., 2005), e a transmissão de *Salmonella* resistentes aos β -lactâmicos diretamente de animais para humanos, devido ao contato próximo ou ao consumo de carne contaminada, tem sido demonstrada em vários relatos (BERTRAND et al., 2006; CLOECKAERT et al., 2007; FEY et al., 2000). De fato, a transmissão de agentes zoonóticos é a primeira via de disseminação da resistência aos antimicrobianos entre animais de produção e humanos (BERTRAND et al., 2006; CLOECKAERT et al., 2007). Neste contexto, Price e colaboradores (2007) demonstraram uma alta prevalência de colonização de trabalhadores em granjas de aves com *E. coli* resistentes à gentamicina, quando comparados com indivíduos na comunidade e hospitalizados.

Além da transferência direta, a transmissão horizontal de genes de resistência da microbiota comensal de animais para bactérias da microbiota intestinal humana tem sido descrita como um importante fator relacionado à disseminação da resistência. Bactérias resistentes presentes em humanos devido ao consumo de alimentos contaminados transmitem genes de resistência via elementos genéticos móveis, tais como transposons e plasmídeos (KRUSE & SORUM, 1994). As principais β -lactamases produzidas por Enterobacteriaceae isoladas de animais são as mesmas produzidas por patógenos ou comensais humanos, e a

origem dos genes de ESBLs em bactérias isoladas de animais é um tema controverso devido aos diversos relatos do movimento dos genes de resistência de humanos para animais ou vice-versa (CLOECKAERT et al., 2007; ENSOR et al., 2007). Alguns autores acreditam que genes de ESBLs em bactérias isoladas de animais tenham origem humana (HERNÁNDEZ et al., 2005), mas as β -lactamases encontradas em bactérias isoladas de humanos podem também ser de origem animal, como foi descrito para *Salmonella* Infantis e Virchow resistentes às cefalosporinas (BERTRAND et al., 2006; CLOECKAERT et al., 2007).

A transferência horizontal de genes é um fenômeno comum na maioria dos microambientes (CASSONE & GIORDANO, 2009). A transmissão de genes de resistência de *E. coli* para *Salmonella* foi demonstrada experimentalmente no trato gastrintestinal de galinhas (GAST & STEPHENS, 1986; POPPE et al., 2005), e existem relatos indicando a aquisição de plasmídeos de resistência por *E. coli* e *Salmonella* no intestino humano (KARAMI et al., 2007; SU et al., 2003; YAN et al., 2005).

Com a globalização do comércio de alimentos, acredita-se que a dispersão de genes de resistência tenha se acentuado, contribuindo para a mudança da prevalência de infecções resistentes em humanos em diferentes regiões do mundo. A aquisição de genes de β -lactamases tanto por *Salmonella* quanto por *E. coli* parece ter aumentado nos últimos anos, com um aumento no número de relatos descrevendo bactérias carreando genes que conferem resistência às novas cefalosporinas (CARATTOLI, 2008; LIEBANA et al., 2006).

1.5 Principais β -Lactamases Detectadas em *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

Em *E. coli* e *Salmonella* spp., as principais β -lactamases são as enzimas do tipo CTX-M, SHV, TEM, GES, PER, VEB, OXA e KPC. As três primeiras são prevalentes em cepas isoladas de carnes e animais de produção, e também em isolados clínicos humanos. Já as enzimas tipo GES, PER, VEB, OXA e KPC são consideradas emergentes em *E. coli* e *Salmonella* spp., assim como em outras espécies de Enterobacteriaceae, isoladas de amostras clínicas. Entretanto, até o presente, as enzimas GES, PER e KPC não foram descritas em cepas isoladas de alimentos. A enzima VEB-1 foi descrita em *Salmonella* Galiema isolada a partir de carne de frango na China (YANG et al., 2010), e a detecção de β -lactamases tipo OXA em carnes e animais de produção têm sido descrita. Na Tunísia, *Escherichia coli* produtora de OXA-1 foi isolada de carne de aves (SOUFI et al., 2009); no Brasil, *Salmonella* Bredeney produtora de OXA-129 foi detectada em porcos (MICHAEL et al., 2008); e em Portugal, *Salmonella* Typhimurium produtora de OXA-30 foi detectada em isolados de

produtos cárneos suínos (ANTUNES et al., 2004). Neste último estudo, foi, ainda, demonstrada, dentro da mesma região geográfica do país, a relação clonal entre cepas isoladas dos produtos alimentícios e cepas isoladas de humanos com manifestações clínicas da infecção (ANTUNES et al., 2004). Por esta razão é importante incluir estas β -lactamases em programas de vigilância e, sendo assim, a produção de tais enzimas será investigada neste estudo.

1.5.1 CTX-M

As ESBLs tipo CTX-M receberam esta denominação por hidrolisarem, preferencialmente, a cefotaxima, apesar de, atualmente, serem conhecidas algumas variantes de CTX-M com alta capacidade hidrolítica sobre a ceftazidima (BONNET et al., 2001; PITOUT et al., 2004; POIREL et al., 2001b). A primeira enzima CTX-M foi caracterizada na Alemanha, em 1989, em um isolado clínico de *E. coli* (PITOUT et al., 2004). Em 1990, foi descrita a CTX-M-2, isolada de cepas de *E. coli* resistentes à cefotaxima durante uma epidemia na Argentina (BAUERNFEIND et al., 1990). Atualmente, são descritas mais de 120 CTX-M (JACOBY & BUSH, 2012), e estas enzimas são as ESBL mais frequentemente encontradas em espécies da família Enterobacteriaceae (BAUERNFEIND et al., 1992; BONNET, 2004; PITOUT et al., 2008).

As ESBL tipo CTX-M são agrupadas de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos em cinco grupos distintos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. O grupo CTX-M-1 inclui as enzimas CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30, -32, -33, -36, -54, -55, -57 e UOE-1. O grupo CTX-M-2 inclui as enzimas CTX-M-2, -4, -7, -20, -31 e -44. O grupo CTX-M-8 inclui as enzimas CTX-M-8, -40 e -63. O Grupo CTX-M-9 inclui as enzimas CTX-M-9, -13, -14, -16 a -19, -21, -27, -45 a -50. O grupo CTX-M-25 inclui CTX-M-25, -26, -39 e -41 (BONNET, 2004; CANTÓN & COQUE, 2006). A similaridade da sequência de aminoácidos das enzimas em um mesmo grupo de CTX-M é superior a 94%, e entre enzimas de grupos diferentes é inferior a 90% (BONNET, 2004). Uma exceção é a enzima CTX-M-45, pertencente ao grupo CTX-M-9. Esta enzima apresenta 86,3% a 88% de similaridade com as demais enzimas pertencentes ao grupo, porém é considerada pertencente ao grupo CTX-M-9 porque o gene *bla*_{CTX-M-45} é variante do gene *bla*_{CTX-M-9}, apresentando uma identidade de 98,1% a 98,5% com os genes que codificam as enzimas do grupo CTX-M-9 (BONNET, 2004; WALTHER-RASMUSSEN & HØIBY, 2004).

O isolamento de Enterobacteriaceae produtoras de CTX-M a partir de animais de produção e carnes tem sido amplamente descrito, como *E. coli* produtoras de CTX-M-2 isoladas de carcaças de gado no Japão (SHIRAKI et al., 2004) e de CTX-M-9 isoladas de carcaças de frango na Espanha (RIÑÓ et al., 2006). Curiosamente, CTX-M-9 é também prevalente em isolados humanos na Espanha. Na França, *Salmonella* Virchow produtora de CTX-M-9 foi isolada em animais criados para consumo humano e, posteriormente, em uma amostra isolada de fezes de uma criança com gastroenterite (WEILL et al., 2004). É interessante destacar que, um ano após a publicação do estudo de Weill e colaboradores (2004), foi descrita, na Dinamarca, a identificação do gene *bla*_{CTX-M-9} em *Salmonella* Virchow isoladas de codornas importadas da França (YONG et al., 2005), o que demonstra o papel da globalização da economia na disseminação de bactérias e de genes de resistência. Um estudo realizado por Ensor e colaboradores (2007) demonstrou que peitos de frango pré-preparados importados do Brasil para o Reino Unido continham *Escherichia coli* produtoras de CTX-M-2 genotipicamente idênticas às encontradas em humanos na América do Sul. A enzima CTX-M-15, a mais amplamente difundida entre as Enterobacteriaceae isoladas de humanos, foi recentemente detectada em *E. coli* isoladas de aves domésticas e porcos (SMET et al., 2008; TIAN et al., 2008). ESBLs como CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-14 têm sido encontradas em *E. coli* isoladas de aves domésticas na Europa (BRIÑAS et al., 2003; GIRLICH et al., 2007; JOUINI et al., 2007; KOJIMA et al., 2005; MACHADO et al., 2008; SMET et al., 2008). No Brasil, um estudo realizado por Peirano e colaboradores (2006) para a identificação de genes de resistência em *Salmonella enterica* isoladas de amostras clínicas humanas, animais, ração animal e alimentos, identificou os genes *bla*_{CTX-M-9} e *bla*_{CTX-M-8}.

Assim como em cepas isoladas de humanos, CTX-M parece predominar em isolados de animais. Em *E. coli* comensais de humanos e animais isoladas na Espanha, as ESBLs mais detectadas são CTX-M-9 e CTX-M-1; em Portugal, SHV-12; na França, CTX-M-14 e CTX-M-32; CTX-M-1 na Itália; e CTX-M-2 no Japão (SMET et al., 2009). A predominância de ESBLs tipo CTX-M em *E. coli* e *Salmonella* isoladas de animais em vários países da Europa também foi descrita por Coque e colaboradores (2008).

A alta prevalência das enzimas CTX-M deve-se à sua grande capacidade de disseminação além do ambiente hospitalar. Isto tem sido demonstrado através da identificação de múltiplos clones bacterianos e elementos genéticos móveis que carregam genes *bla*_{CTX-M} (CANTÓN & COQUE, 2003; PATERSON & BONOMO, 2005; PITOUT et al., 2008; TALBOT et al., 2006).

As ESBLs tipo CTX-M são codificadas por genes localizados em plasmídeos (BARLOW et al., 2008) e associados aos diferentes elementos genéticos móveis, incluindo as sequências de inserção e elementos relacionados a bacteriófagos (CANTÓN & COQUE, 2006). Estudos moleculares demonstram que a mobilização de *bla*_{CTX-M} é mediada por, pelo menos, duas sequências de inserção bem caracterizadas, *ISEcp1* ou *ISCR1* (POIREL et al., 2000). As *ISEcp1* estão associadas com a maioria dos genes *bla*_{CTX-M} dos grupos CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-9. *ISCR1* estão normalmente ligadas aos genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9} e *bla*_{CTX-M-14} (CANTÓN & COQUE, 2006), e inseridas em integrons de classe 1 (TOLEMAN et al., 2006). *ISCR1* é reconhecida como um importante elemento genético na captura dos mais diferentes genes de resistência aos antimicrobianos por plasmídeos conjugativos, o que favorece sua manutenção em função da pressão seletiva exercida pela terapia antimicrobiana (ALEKSHUM & LEVY, 2004; CANTÓN & COQUE, 2006; CARATTOLI, 2008; FLUIT & SCHMITZ, 2004; PITOUT, 2008). Elementos relacionados aos bacteriófagos foram identificados no ambiente genético de *bla*_{CTX-M-10} na Espanha (OLIVER et al., 2005).

1.5.2 TEM e SHV

As β -lactamases do tipo TEM constituem uma importante família de β -lactamases, com grande impacto clínico. A primeira variante descrita, TEM-1, foi assim nomeada em homenagem a uma menina grega de nome Temoneira, de quem foi isolada (NAAS et al., 2008).

As β -lactamases do tipo SHV são assim denominadas em função da sua estrutura química (“sulphydryl variable”) (NAAS et al., 2008). Também são enzimas extremamente disseminadas entre as Enterobacteriaceae, além de serem encontradas em outros bacilos Gram-negativos (LIVERMORE & WOODFORD, 2006).

Todas as ESBLs do tipo TEM são derivadas de enzimas de espectro restrito TEM-1 e TEM-2, e as do tipo SHV são derivadas de enzimas de espectro restrito SHV-1. TEM-1, TEM-2 e SHV-1 são codificadas por genes tipo *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} localizados no cromossomo bacteriano (GUPTA et al., 2007; LIVERMORE, 1995; PATERSON & BONOMO, 2005). Mutações pontuais em *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-2} e *bla*_{SHV-1} resultaram em remodelagem do sítio ativo da enzima e expansão de sua atividade hidrolítica (JACOBY & BUSH, 2005). Ao contrário das ESBLs do tipo CTX-M, as SHV e TEM apresentam maior eficiência hidrolítica sobre a ceftazidima do que sobre a cefotaxima (BONNET, 2004).

SHV-2 foi a primeira ESBL do tipo SHV descrita, identificada em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens* (KNOTHE et al., 1983). Em 1987, foi descrita TEM-3, a primeira ESBL do tipo TEM, identificada em isolados clínicos de *K. pneumoniae* (SIROT et al., 1987). Atualmente, ESBLs dos tipos TEM e SHV são de ocorrência mundial, inclusive no Brasil (BONNET, 2004; CORKILL et al., 2001; GARCIA et al., 2008; MENDES et al., 2004; MINARINI et al., 2007; TOLLENTINO et al., 2011). Essas enzimas, codificadas por genes localizados em transposons, se disseminam facilmente através de plasmídeos conjugativos entre diferentes espécies de bactérias (HÆGGMAN et al., 2004; JACOBY & MUÑOZ-PRICE, 2005; PITOUT et al., 2008) e são identificadas em importantes patógenos da família Enterobacteriaceae (HERITAGE et al., 1999).

A detecção das ESBLs TEM-52 e SHV-12 em Enterobacteriaceae isoladas de aves produtoras tem sido descrita no continente Europeu (BRIÑAS et al., 2003; CLOECKAERT et al., 2007; HASMAN et al., 2005; MACHADO et al., 2008; RIAÑO et al., 2006; SMET et al., 2008). Em um estudo realizado na Espanha (BRIÑAS et al., 2003), cepas de *E. coli* isoladas de amostras fecais de frangos saudáveis apresentaram os genes *bla*_{TEM-1b} e *bla*_{SHV-12}. Cloeckert e colaboradores (2007) detectaram o gene *bla*_{TEM-52} em cepas de *Salmonella enterica* isoladas de aves produtoras entre 2001 e 2005. Smet e colaboradores (2008) encontraram alta prevalência de *bla*_{TEM} em *E. coli* isoladas de frangos de diferentes granjas na Bélgica. Na França, Madec e colaboradores (2008) identificaram cepas de *E. coli* isoladas de gado carreadoras de *bla*_{TEM-126} e *bla*_{SHV-12}.

1.5.3 PER , VEB e GES

As ESBLs dos tipos PER, VEB e GES, apesar de não serem tão prevalentes como CTX-M, TEM e SHV, têm ganhado importância nos últimos anos devido ao crescimento na frequência de seu isolamento em Enterobacteriaceae e bacilos Gram-negativos não-fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (NAAS et al., 2008). Essa disseminação justifica a inclusão destas enzimas neste estudo, tendo em vista que estudos anteriores já confirmaram a semelhança entre a epidemiologia das ESBLs em bactérias isoladas de humanos e animais de produção.

As enzimas do tipo PER (“*Pseudomonas* extended resistance”) são pouco relacionadas às outras ESBLs, e receberam esse nome devido ao seu primeiro isolamento em uma cepa de *Pseudomonas*. Apesar de serem classificadas como enzimas da classe A de Ambler, devido à sua maquinaria catalítica, sua estrutura tridimensional revela que formam um subgrupo na

superfamília Classe A (NORDMANN & NAAS, 1994; TRANIER et al., 2000). Esse tipo de enzima confere resistência às penicilinas, à cefotaxima, à ceftazidima e ao aztreonam, e sua atividade é bem inibida pelo clavulanato, sulbactam e tazobactam (NORDMANN et al., 1993; NORDMANN & NAAS, 1994). PER-1 foi detectada em 1993 na França, em um paciente vindo da Turquia (NORDMANN et al., 1993). O gene *bla*_{PER-1} é amplamente distribuído em *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*, mas também já foi detectado em *Salmonella* Typhimurium, *Providencia rettgeri* e *Proteus mirabilis* (AKTAS et al., 2005; KOLAYLI et al., 2005; MIRÓ et al., 2005). A enzima PER-2, que apresenta 86% de homologia na sequência de aminoácidos com PER-1, tem sido relatada apenas na América do Sul (CELENZA et al., 2006; PASTERÁN et al., 2006; PETRONI et al., 2002; QUINTEROS et al., 2003; VIGNOLI et al., 2005). PER-2 foi encontrada em *Salmonella* Typhimurium na Argentina em 1996 (BAUERNFEIND et al., 1996) e, subsequentemente, em *Salmonella* Senftenberg, *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Vibrio cholerae* e, recentemente, em *A. baumannii* (CELENZA et al., 2006; NOGUEIRA, 2011; PASTERÁN et al., 2006; PETRONI et al., 2002; QUINTEROS et al., 2003; VIGNOLI et al., 2005).

O gene *bla*_{VEB-1} foi detectado pela primeira vez em 1996, em uma cepa de *E. coli* isolada no Vietnã, a razão de seu nome – “Vietnam extended-spectrum β -lactamase” (NAAS et al., 2001; POIREL et al., 1999). A enzima VEB-1 tem sua maior identidade de aminoácidos com as enzimas PER-1 e PER-2 (38%) (NORDMANN & NAAS, 1994). A atividade contra cefalosporinas de amplo espectro é, em geral, muito alta, exceto para a ceftazidima, enquanto as atividades hidrolíticas contra penicilinas e o aztreonam são muito menores (POIREL et al., 1999). VEB-1 encontra-se amplamente disseminada na Tailândia e no Vietnã, onde mais de 40% das Enterobacteriaceae resistentes à ceftazidima são produtoras dessa enzima, e 80% das *P. aeruginosa* também o são (CAO et al., 2002; CHANAWONG et al. 2001; GIRLICH et al., 2002). Além disso, surtos envolvendo isolados produtores de VEB-1 têm sido descritos, incluindo *A. baumannii* na França e na Bélgica (NAAS et al., 2006a; NAAS et al., 2006b), *P. mirabilis* na Coreia (KIM et al., 2004) e *E. cloacae* produtor de VEB-3 na China (JIANG et al., 2005).

ESBLs do tipo GES (“Guyana ESBL”) são relatadas cada vez mais em bacilos Gram-negativos, incluindo *P. aeruginosa*, *E. coli* e *K. pneumoniae* (DE VRIES et al., 2006; DUARTE et al., 2003; GIAKKOUPIS et al., 2000; JEONG et al., 2005; KARTALI et al., 2002; NAAS et al., 2008; POIREL et al., 2002; POIREL et al., 2005;). GES-1 foi inicialmente identificada em um isolado de *Klebsiella pneumoniae*, em 1998, na França, a partir de uma paciente previamente hospitalizada na Guiana Francesa (POIREL et al., 2000), e possui um

perfil de hidrólise similar ao das ESBLs da classe A de Ambler inibidas por clavulanato, incluindo a atividade contra as penicilinas e cefalosporinas de espectro estendido, mas não cefamicinas e carbapenêmicos. Diferentemente da maioria das ESBLs, GES-1 não hidrolisa o aztreonam (NAAS et al., 2008). A disseminação de ESBLs tipo GES é preocupante, pois algumas destas enzimas (GES-2, GES-4, GES-5, GES-6 e GES-8) evoluíram com a atividade de carbapenemase e são capazes de hidrolisar o imipenem, droga β -lactâmica utilizada como uma das últimas opções terapêuticas para infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes (POIREL et al., 2001a; YIGIT et al., 2001).

1.5.4 OXA

Embora a definição de ESBLs seja frequentemente restrita às enzimas da classe A, algumas β -lactamases tipo OXA são consideradas ESBLs devido à extensão do espectro de ação sobre as cefalosporinas de espectro estendido, mesmo sendo fracamente inibidas pelo clavulanato (BRADFORD, 2001; NAAS et al., 2008; PATERSON & BONOMO, 2005). As OXA são assim denominadas devido à sua habilidade de hidrolisar a oxacilina (NAAS et al., 2008). Quanto à classificação, as enzimas OXA pertencem ao grupo D de Ambler e ao grupo 2d de Bush-Jacoby-Medeiros (NAAS et al., 2008).

A maioria das β -lactamases do tipo OXA não hidrolisa, de forma significativa, as cefalosporinas de amplo espectro, e a sua evolução a partir de enzimas com espectros de ação limitados possui muitos paralelos com a evolução das ESBLs do tipo TEM e SHV. As ESBLs tipo OXA derivam de OXA-10 (OXA-11, OXA-14, OXA-16 e OXA-17) ou OXA-13 (OXA-19 e OXA-28), que é derivada de OXA-10. Poucas derivam de OXA-2 (OXA-15 e OXA-32), e OXA-18 e OXA-45 não são derivadas de nenhuma OXA atualmente conhecida (BRADFORD, 2001; NAAS et al., 2008). Em 2010, entre as 147 β -lactamases do tipo OXA descritas, apenas 19 eram caracterizadas como ESBLs e 64 eram da classe D de Ambler, com capacidade de hidrolisar o imipenem (POIREL et al., 2010).

As ESBLs do tipo OXA exibem considerável diversidade de atividade enzimática. As enzimas OXA-10 e OXA-13 hidrolisam fracamente a cefotaxima, a ceftriaxona e o aztreonam, enquanto que OXA-17 confere resistência à cefotaxima e à ceftriaxona, mas uma fraca proteção contra a ceftazidima (BRADFORD, 2001). A maioria das ESBLs derivadas de OXA-10 confere uma maior resistência à cefotaxima e significativa resistência à ceftazidima e ao aztreonam (BRADFORD, 2001; PATERSON & BONOMO, 2005). Apesar de a maioria das enzimas do tipo OXA ser resistente aos inibidores de β -lactamases, OXA-18 e OXA-45

foram relatadas como sendo bastante inibidas pelo clavulanato (PHILIPPON et al., 1997; TOLEMAN et al., 2003).

Apesar da maior ocorrência de ESBLs tipo OXA ser descrita em *P. aeruginosa*, estas enzimas têm sido detectadas em outras bactérias Gram-negativas, incluindo as Enterobacteriaceae (CARRÈR et al., 2010; CASTANHEIRA et al., 2011; POIREL et al., 2011).

1.5.5 KPC

As enzimas do tipo KPC (“*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase”) compreendem um pequeno grupo de β -lactamases da classe A de Ambler com atividade sobre os carbapenêmicos. Estas enzimas hidrolisam penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, monobactâmicos e carbapenêmicos com eficiência variável, sendo que as cefamicinas e a ceftazidima são fracamente hidrolisadas, e a cefotaxima, o aztreonam e os carbapenêmicos imipenem, meropenem e ertapenem, são hidrolisados com menos eficiência quando comparados às penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração. As KPC são comumente confundidas com outras ESBLs; entretanto, estas enzimas são fracamente inibidas pelos inibidores das β -lactamases. É importante ressaltar que as enzimas KPC, isoladamente, apenas reduzem a susceptibilidade aos carbapenêmicos, e que a resistência é dependente da coexistência de outros mecanismos, como a redução da permeabilidade da membrana (NORDMANN et al., 2009).

A enzima KPC-1 foi identificada em *Klebsiella pneumoniae* nos EUA (YIGIT et al., 2001). Após a primeira descrição, enzimas KPC foram detectadas em outros hospitais nos EUA e, posteriormente, em Israel, na Europa e na América do Sul (LEAVITT et al., 2007; PEIRANO et al., 2009; VILLEGAS et al., 2007; WOLTER et al., 2008). A localização plasmidial dos genes de KPC e sua associação com transposons facilitam sua disseminação, e atualmente estas enzimas são detectadas em outras espécies da família Enterobacteriaceae (HOSSAIN et al., 2004; MIRIAGOU et al., 2003; MOLAND et al., 2002; RASHEED et al., 2008), o que sugere a possibilidade da sua ocorrência em isolados de animais de produção ou alimentos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. isoladas de amostras de carnes de frango, suína e bovina comercializadas em São José do Rio Preto-SP, e identificar nestes isolados os genes responsáveis pela produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs).

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a presença de *E. coli* e *Salmonella* spp. em amostras de carne de frango, suína e bovina comercializadas para o consumo humano em São José do Rio Preto-SP.
- Identificar, nas cepas isoladas, o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos β -lactâmicos comumente utilizados na clínica médica e veterinária, e identificar as cepas produtoras de ESBLs.
- Pesquisar, pelo método da PCR, nas cepas resistentes às cefalosporinas de terceira geração, a presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES}, *bla*_{PER} e *bla*_{VEB}, responsáveis pela produção de ESBLs.
- Caracterizar o ambiente genético dos genes *bla*_{CTX-M} encontrados.
- Sequenciar os genes de ESBLs detectados.
- Realizar a tipagem molecular, pelo método de ERIC-PCR, dos isolados do estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento, Identificação e Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos das Cepas do Estudo

As análises foram realizadas, com algumas modificações, de acordo com o método padronizado pela Food and Drug Administration (FDA) (EUA, 2007).

Foram adquiridas três amostras de cada tipo de carne (bovina, de frango e suína) em dias distintos, em quatro diferentes estabelecimentos comerciais (denominados como A, B, C e D) na cidade de São José do Rio Preto – SP. Dos estabelecimentos A e B foram adquiridas amostras dos três tipos de carne, enquanto que no estabelecimento C foram adquiridas carnes resfriadas bovina e suína, e no estabelecimento D, apenas carne resfriada de frango. As amostras de carne foram obtidas de novembro de 2010 a agosto de 2011.

Inicialmente, foi realizado um estudo piloto, para o qual foram adquiridas uma amostra de carne resfriada bovina (CRB) – coxão mole –, uma carne resfriada de frango (CRF) – coxa com sobre-coxa – e uma carne resfriada suína (CRS) – pernil –, em datas distintas no estabelecimento A. Cada amostra de carne foi submetida à lavagem de superfície com três diferentes diluentes (caldo tetracionato contendo 5% de caldo verde brilhante, caldo lactosado e água peptonada 0,1%, todos Oxoid, Hampshire, Inglaterra), visando determinar qual favoreceria a melhor recuperação de *Salmonella* spp. e de *Escherichia coli*.

Dentre as amostras adquiridas para o estudo piloto, o pernil suíno resfriado foi a única amostra disposta em bandeja de isopor pelo próprio estabelecimento comercial; as demais foram adquiridas diretamente no açougue do estabelecimento. No laboratório de pesquisa, as amostras foram fracionadas em condições assépticas, no interior de capela de fluxo laminar com o auxílio de facas estéreis, de forma a obter aproximadamente três porções de 200 g de CRB, três porções de CRF e três de CRS. As porções foram acondicionadas individualmente em embalagens Whirl-Pak[®] estéreis de 532 mL (Nasco, WI, USA). Em cada uma de três embalagens para cada tipo de carne foi adicionado 200 mL de um dos diluentes (uma embalagem com água peptonada 0,1% mais 200 g de CRB ou CRF ou CRS, outra embalagem com caldo lactosado mais outra porção de 200 g de CRB ou CRF ou CRS e uma terceira embalagem com caldo tetracionato acrescido de 5% de caldo verde brilhante mais outra porção de CRB ou CRF ou CRS), obtendo-se, ao final, nove embalagens com conteúdos diferentes. A utilização de caldo tetracionato contendo 5% de caldo verde brilhante é um protocolo adotado pelo Laboratório de Microbiologia da empresa Cobb-Vantress Brasil Ltda.,

unidade de Guapiaçu-SP, que foi validado pela referida empresa e descrito como promotor de excelente resultado na recuperação de *Salmonella* spp.

Após incubação a 37 °C por 24 horas sob agitação de 130 rpm, alíquotas de 1 mL de cada um dos três diluentes foram dispensadas em tubos contendo 9 mL de caldo lactosado, obtendo-se, assim, uma diluição de 10^{-1} para cada diluente. As diluições seguiram, da mesma maneira, até atingirem a concentração de 10^{-5} . Ao final das diluições, foram semeados 10 µL (com alça estéril calibrada) de cada diluição e direto do diluente, em uma placa de Petri com ágar Eosina Azul de Metileno – EMB (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) e outra contendo ágar MacConkey (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), a fim de se capturar colônias características de *E. coli*. Para a recuperação de *Salmonella*, alíquotas de 1 mL e 0,1 mL foram dispensadas, respectivamente, em tubos contendo 10 mL de caldo tetrationato (caldo TT) ou de caldo Rappaport-Vassiliadis (caldo RV), ambos Oxoid (Hampshire, Inglaterra). As placas de ágar com as diluições e os tubos de caldo TT foram incubados a 37 °C por 24 horas, e os tubos inoculados de caldo RV foram incubados a 42 °C por 24 horas. Após a incubação, os caldos TT e RV foram semeados, com alça estéril calibrada de 10 µL, nos ágares Xilose Lisina Desoxicolato – XLD, Entérico de Hektoen – HE e Bismuto Sulfito – BS, todos os três da Oxoid (Hampshire, Inglaterra), e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

As colônias de coloração verde-metálica observadas no ágar EMB foram consideradas como *E. coli* e re-isoladas em EMB, sendo nomeadas como “Ec” seguido de um número na coleção de cultura. As demais colônias lactose positivas, bem como as colônias lactose positivas na ágar MacConkey, foram também coletadas, visando estudos futuros, e foram nomeadas “Lac” seguido de um número na coleção de cultura. As colônias que apresentaram características típicas de *Salmonella* spp. nos ágares XLD, HE e BS, foram coletadas, re-isoladas no mesmo ágar de origem e nomeadas com “S” seguido de um número na coleção de cultura. Posteriormente, estas colônias foram inoculadas nos ágares Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e Lisina Ferro (LIA), ambos da Oxoid (Hampshire, Inglaterra), visando à confirmação da identificação como *Salmonella* spp.

As amostras de carnes obtidas após o estudo piloto (duas amostras de CRF – ambas coxa com sobre-coxa –, duas mostras de CRS – ambas bisteca – e duas amostras de CRB – ambas coxão mole) foram processadas utilizando-se o caldo tetrationato acrescido de 5% de caldo verde brilhante para a lavagem superficial das amostras, e o caldo TT como meio de enriquecimento seletivo. Essas amostras foram adquiridas nos estabelecimentos B, C e D.

Os isolados bacterianos do estudo foram cultivados em três diferentes placas de ágar MacConkey contendo Cefoxitina (2 µg/mL) ou Cefotaxima (1 µg/mL) ou Ceftazidima (1

µg/mL), visando selecionar cepas resistentes aos β-lactâmicos (RAYAMAJHI et al., 2010). Posteriormente, os isolados foram também submetidos ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos de acordo com as recomendações do CLSI (2011). Foram utilizados discos comercialmente disponíveis (Oxoid – Hampshire, Inglaterra) dos antimicrobianos Ácido Nalidíxico, Amicacina, Aztreonam, Cefalotina, Cefepime, Cefotaxima, Cefoxitina, Ceftazidima, Ceftiofur, Ceftriaxona, Enrofloxacina, Ertapenem, Gentamicina, Imipenem, Levofloxacina, Moxifloxacina, Ofloxacina e Tobramicina, e às combinações de β-lactâmico/inibidor de β-lactamase Amoxicilina/Ácido Clavulânico, Ampicilina/Sulbactam e Piperacilina/Tazobactam. As cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 foram utilizadas como controles. Os resultados foram interpretados de acordo com o CLSI (2011), exceto para a Moxifloxacina, que segue as normas do EUCAST (2011), e para o Ceftiofur e a Enrofloxacina, que seguem o CLSI de recomendações para bactérias isoladas de animais (2008).

Cepas de Enterobacteriaceae apresentando resistência a drogas β-lactâmicas com perfil sugestivo de produção de ESBLs foram selecionadas e submetidas à identificação automatizada, utilizando-se o sistema Vitek 2 Compact e o cartão GN (bioMérieux, França), seguindo as orientações do fabricante.

3.2 Estudos Moleculares

3.2.1 Extração do DNA genômico

Para a extração de DNA das amostras, foi desenvolvido o seguinte procedimento: uma colônia isolada, em ágar MacConkey, foi incubada por 24 horas a 37 °C em caldo Triptona de Soja – TSB (Oxoid, Hampshire, Inglaterra). Em seguida, 1,5 mL desse caldo foram centrifugados a 15000 G por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O “pellet” foi homogeneizado em 200 µL de água Milli-Q (Millipore) e submetido à nova centrifugação a 15000 G por 10 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi homogeneizado em 40 µL de água Milli-Q e incubado a 100 °C por 10 minutos. Após essa fase de liberação do DNA, a mistura foi submetida a choque térmico, em gelo, por 2 minutos e centrifugada a 15000 G por 10 segundos a 4 °C. O sobrenadante, contendo o DNA, foi acondicionado em outro tubo de polipropileno de 1,5 mL, previamente identificado, onde foram adicionados 500 µL de etanol absoluto (Merck Chemicals) (-20 °C) e deixado em gelo por 20 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 16000 G por 10 minutos e o

sobrenadante foi descartado. Foram, então, adicionados, 300 mL de etanol 70% (-20 °C) e, novamente, a mistura foi submetida à centrifugação a 16000 G por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e, após todo o etanol ter evaporado, o DNA foi homogeneizado com 100 µL de tampão TE e 2 µL de RNase (2 µg/mL) e incubados por 30 minutos a 37 °C em termobloco Thermomixer comfort (Eppendorf). O DNA foi estocado a -20 °C até o seu uso.

3.2.2 Testes com a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional

Para todas as reações de PCR realizadas no estudo foi utilizado o “kit” Taq DNA Polymerase (Fermentas, Life Sciences, MD, EUA) e o termociclador Veriti Thermal Cycler, (Applied Biosystems, EUA), à exceção do método de Real-Time PCR (ver seção 3.2.6).

Nas cepas onde se constatou perfis de resistência aos antimicrobianos característicos da produção de alguma ESBL, foram realizadas PCR para detectar os genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* e *bla_{GES}*, utilizando-se os *primers* descritos na Tabela 1.

Para a detecção de todos os genes de β-lactamases (*bla*), seguiu-se o mesmo protocolo (TOLLENTINO et al., 2011). Em tubo de polipropileno de 200 µL, foram adicionados 2 µL de DNA extraído e os seguintes reagentes: 2,5 µL de tampão (10X), 2,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,0 µL de dNTP (2,5 mM), 1,0 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 0,2 µL de Taq DNA Polymerase (5 U/µL) e q.s.p. 25 µL de água UltraPure (Invitrogen, CA, EUA). Os tubos foram colocados em termociclador, programado com passo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos sequenciais de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, hibridização a 53 °C – para os genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{GES}* – ou a 55 °C – para *bla_{CTX-M}* – por 30 segundos, e extensão a 72 °C por 30 segundos, com uma fase de extensão final a 72 °C por 7 minutos. Uma reação sem amostra de DNA foi utilizada como controle negativo; como controle positivo para cada reação, foram utilizados DNA de cepas bacterianas pré-caracterizadas por sequenciamento no Laboratório de Microbiologia da FAMERP, para a presença de *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* e *bla_{GES}*. Os produtos amplificados nas reações (“amplicons”) foram analisados em gel de agarose a 1,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL/100 mL). A eletroforese foi realizada a 100 V/cm por 60 minutos, utilizando o marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, CA, EUA). O resultado foi observado sob luz ultravioleta e fotografado utilizando o aparelho Kodak Gel Logic 2200 Imaging System (Molecular Imaging Software).

Nas cepas onde foi detectado o gene *bla_{CTX-M}* foram realizadas três diferentes PCR – *primers* listados na Tabela 1 – para a detecção dos genes das integrases dos integrons de

classe 1, classe 2 e classe 3 (XU et al., 2007). Em tubo de polipropileno de 200 μ L, foram adicionados 2 μ L de DNA extraído e os reagentes: 2,5 μ L de tampão (10X), 2,0 μ L de $MgCl_2$ (25 mM), 1,0 μ L de dNTP (2,5 mM), 1,0 μ L de cada *primer* (10 μ mol/ μ L), 0,2 μ L de Taq DNA Polymerase (5 U/ μ L) e q.s.p. 25 μ L de água UltraPure. As reações ocorreram sob as condições de desnaturação inicial do DNA a 95 °C por 2 minutos, 35 ciclos das etapas subsequentes de desnaturação a 95 °C por 20 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos e extensão a 70 °C por 30 segundos, e uma etapa de extensão final a 70 °C por 7 minutos. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose a 1,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 μ L/100 mL) e a eletroforese foi realizada a 100 V/cm por 60 minutos, com o marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas, Life Sciences, MD, EUA) para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. Os géis foram visualizados e fotografados conforme descrito anteriormente.

Tabela 1 – *Primers* utilizados nas PCR de detecção e ERIC-PCR.

Alvo	Primers	"Amplicon"	Referência
<i>bla</i> _{TEM}	Primer forward: 5'-ATAAAATCTTGAAGACGAAA-3' Primer reverse: 5'-GACAGTTACCAATGCCTTAATCA-3'	1088 pb	Tollentino et al., 2011
<i>bla</i> _{SHV}	Primer forward: 5'-GGGTTATTCTTATTTGTCGC-3' Primer reverse: 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3'	861 pb	Tollentino et al., 2011
<i>bla</i> _{CTX-M}	Primer forward: 5'-TTTGCGATGTGCAGTACCAAGTAA-3' Primer reverse: 5'-CGATATCGTTGGTGGTGCCATA-3'	544 pb	Tollentino et al., 2011
<i>bla</i> _{GES}	Primer forward: 5'-ATGCGCTTCATTACGCAC-3' Primer reverse: 5'-CTATTGTCCGTGCTCAGG-3'	864 pb	Tollentino et al., 2011
<i>intI1</i>	Primer forward: 5'-GTTCCGGTCAAGGTTCTGG-3' Primer reverse: 5'-CGTAGAGACGTCGGAATG-3'	890 pb	Xu et al., 2007
<i>intI2</i>	Primer forward: 5'-CAAGCATCTCTAGGCGTA-3' Primer reverse: 5'-AGAAGCATCAGTCCATCC-3'	1056 pb	Xu et al., 2007
<i>intI3</i>	Primer forward: 5'-CATCAAGCTGCTCGATCA-3' Primer reverse: 5'-ACAACCTCTGCACCGTTC-3'	878 pb	Xu et al., 2007
integron de classe 1	Primer forward: 5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3' Primer reverse: 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'	variável	Arduino et al., 2002
<i>invA</i> (qPCR)	Primer forward: 5'-AAACGTTGAAAACTGAGGA-3' Primer reverse: 5'-TCGTCAATCCATTACCTACC-3'	não se aplica	Hoorfar et al., 2000
ERIC-PCR	Primer forward: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	variáveis	Peng et al., 2007

Para amplificar a região onde estão localizados os cassetes gênicos dos integrons de classe 1, configurando a detecção da presença deste, foi utilizado o par de *primers* (Tabela 1) descrito por Arduino e colaboradores (2002). Em tubo de polipropileno de 200 μ L, foram adicionados 2 μ L de DNA extraído e os reagentes: 2,5 μ L de tampão (10X), 2,0 μ L de $MgCl_2$ (25 mM), 1,0 μ L de dNTP (2,5 mM), 1,0 μ L de cada *primer* (10 μ mol/ μ L), 0,2 μ L de Taq DNA Polymerase (5 U/ μ L) e q.s.p. 25 μ L de água UltraPure. As reações ocorreram sob as

condições de desnaturação inicial do DNA a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos das etapas subsequentes de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, e uma etapa de extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose a 1,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL/100 mL) e a eletroforese foi realizada a 100 V/cm por 60 minutos, com o marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas, Life Sciences, MD, EUA) para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. Os géis foram visualizados e fotografados conforme descrito anteriormente. Como controle positivo para a reação foi utilizado o DNA de uma cepa previamente testada e sequenciada no Laboratório de Microbiologia da FAMERP, que apresenta um integron de classe 1.

3.2.3 Multiplex-PCR

A fim de se testar um novo protocolo que reduza tempo e material gasto com PCR para a detecção dos três principais genes responsáveis pela resistência aos β-lactâmicos detectados em Enterobacteriaceae, ou seja, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, foi desenvolvido um método de multiplex-PCR. Para tanto, foram utilizados os mesmo pares de *primers* das PCR convencionais (Tabela 1). Em tubo de polipropileno de 200 µL, foram adicionados 2 µL de DNA extraído e os seguintes reagentes: 2,5 µL de tampão (10X), 2,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,0 µL de dNTP (2,5 mM), 1,0 µL de cada um dos seis *primers* (10 pmol/µL), 0,2 µL de Taq DNA Polymerase (5 U/µL) e q.s.p. 25 µl de água UltraPure. Os tubos foram colocados em termociclador, programado com passo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos sequenciais de desnaturação a 95° C por 30 segundos, hibridização a 53 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, com uma fase de extensão final a 72 °C por 7 minutos. Uma reação sem amostra de DNA foi utilizada como controle negativo e, como controle positivo, foi utilizado o DNA de uma cepas bacteriana contendo *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}, pré-caracterizada por sequenciamento no Laboratório de Microbiologia da FAMERP. Os “amplicons” foram analisados em gel de agarose a 1,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL/100 mL) e possuem os mesmos tamanhos de banda encontrados na amplificação de PCR convencional para esses genes. A eletroforese foi realizada a 100 V/cm por 60 minutos, utilizando o marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas, Life Sciences, MD, EUA). O resultado foi observado sob luz ultravioleta e fotografado conforme descrito anteriormente.

Quando mais de um gene foi detectado em uma mesma bactéria, foi realizada uma PCR convencional, como descrito na seção 3.2.2, para amplificar os genes separadamente e purificá-los, proporcionando melhor resultado na RFLP, no caso dos genes *bla*_{CTX-M}, e nos sequenciamentos desses três genes (ver seções 3.2.5 e 3.2.7, respectivamente).

3.2.4 Purificação dos “amplicons”

Todos os produtos obtidos nas reações de PCR foram purificados com etanol. O “amplicon” de cada reação foi transferido para um tubo de polipropileno de 1,5 mL previamente identificado, onde foram adicionados acetato de sódio 3 M e etanol absoluto, nas proporções de 10% e 3 vezes, respectivamente, do volume de “amplicons” que foi purificado. Os tubos foram colocados em freezer -80 °C por 1 hora para a precipitação do DNA. Em seguida, foram centrifugados a 16000 G por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 70%. Por fim, os tubos foram centrifugados a 16000 G por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi homogeneizado em 20 µL de tampão TE e estocado a -20 °C até o seu uso.

3.2.5 Agrupamento dos genes *bla*_{CTX-M} por RFLP

A análise de RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism” – foi realizada para agrupar os genes *bla*_{CTX-M} identificados entre os grupos previamente descritos (BONNET, 2004). As endonucleases de restrição utilizadas foram selecionadas de acordo com metodologia anteriormente descrita (EDELSTEIN et al., 2003). Os padrões de restrição dos produtos de PCR, gerados pelas endonucleases *PstI* e *PvuII* para a diferenciação entre os grupos de CTX-M, estão descritos na Tabela 2 e abaixo.

Tabela 2 – Padrões de restrição gerados pelas endonucleases nos genes codificadores de CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-8.

Grupos de <i>bla</i> _{CTX-M}	Sítios de Restrição		Tamanhos das bandas após a digestão (pb)
	<i>PstI</i>	<i>PvuII</i>	
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	0	2	267, 156, 121
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	1	0	355, 188
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	0	0	544

Diferentes enzimas do grupo CTX-M-9 apresentam diferentes perfis de restrição quando digeridas com as enzimas *PstI* e *PvuII*. Os genes *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-13} e *bla*_{CTX-M-16}

são digeridos pelas duas enzimas em diferentes sítios de restrição, gerando um padrão de digestão com 3 bandas de 426, 72 e 46 pb. Os genes *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-17}, *bla*_{CTX-M-19}, e *bla*_{CTX-M-21} são digeridos apenas pela enzima *PvuII* em 1 sítio de restrição, gerando duas bandas de 472 e 72 pb.

Para a reação de RFLP, 10 µL de DNA purificado das cepas foram adicionados em tubo de polipropileno de 1,5 mL, previamente identificado, juntamente com os seguintes reagentes (Invitrogen, CA, EUA), de acordo com a metodologia descrita por Edelstein e colaboradores (2003): 2,0 µL de tampão React II (10X), 2,0 µL de BSA (100X), 1,0 µL de enzima *PstI* (10 U/µL), 0,5 µL de enzima *PvuII* (10 U/µL) e q.s.p. 20 µL de água UltraPure. Os tubos foram incubados a 37 °C por 3 horas em termobloco Thermomixer comfort (Eppendorf). Os produtos foram analisados em gel de agarose a 2,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL/100 mL). A eletroforese foi realizada a 50 V/cm por 120 minutos, utilizando o marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, CA, EUA). O resultado foi observado sob luz ultravioleta e fotografado conforme descrito anteriormente.

3.2.6 Confirmação da identificação de *Salmonella* através da técnica de PCR em Tempo Real (qPCR)

As colônias que apresentaram morfologia típica de *Salmonella* spp. nos ágaros TSI e LIA foram submetidas ao teste molecular de identificação pelo método de Real-Time PCR (qPCR), cujos *primers* utilizados têm como alvo o gene *invA*. Este procedimento foi, em grande parte, realizado no Laboratório de Microbiologia da empresa Cobb-Vantress Brasil Ltda., unidade de Guapiaçu-SP, que emprega modificações do protocolo padronizado por Charlton e colaboradores (2005). Em microplacas MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, CA, EUA) foram adicionados em cada poço: 5 µL do “kit” Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, CA, EUA), 1 µL de cada *primer* na concentração de 10 pmol/µL (Tabela 1) e 3 µL do DNA extraído da amostra testada. A reação ocorreu em termociclador StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, EUA) sob as condições de ativação da enzima a 95 °C por 20 segundos, e 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 3 segundos e anelamento e extensão a 60 °C por 30 segundos; por fim, para a confecção da curva de temperatura, as amostras foram submetidas a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos. Usando como controle uma cepa padrão de *Salmonella*, as cepas com a temperatura de “melting” por volta de 74 °C foram consideradas

como pertencentes ao gênero, pois essa temperatura varia entre os taxa bacterianos e é específico de cada um, sofrendo alterações de acordo com o protocolo utilizado.

3.2.7 Sequenciamento dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}

Os “amplicons” purificados logo após as reações de PCR para a detecção de genes de ESBLs foram submetidos ao sequenciamento com o *Big Dye Terminator Kit v3.1* (Applied Biosystems, CA, EUA), segundo as recomendações do fabricante, com a finalidade de identificar o tipo de ESBL produzida, as possíveis mutações e sua associação com o fenótipo de resistência apresentado.

Somente para o gene *bla*_{CTX-M} ocorreu uma reação de PCR anterior ao sequenciamento. Após a RFLP, onde se determinou a qual grupo de *bla*_{CTX-M} pertencia o gene detectado, este foi amplificado com *primers* específicos para o grupo encontrado (Tabela 3), de acordo com Saladin e colaboradores (2002): em tubos de polipropileno de 200 µL foram adicionados 2 µL do DNA extraído e os seguintes reagentes: 5,0 µL de tampão (10X), 4,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 4,0 µL de dNTP (2,5 mM), 2,5 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 0,2 µL de Taq DNA Polymerase (5 U/µL) e q.s.p. 50 µL de água UltraPure. Inicialmente, o DNA foi desnaturado a 95 °C por 5 minutos, sendo submetido a 25 ciclos com as etapas de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 56 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os produtos de todas as reações foram analisados em gel de agarose a 1,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL/100 mL) e a eletroforese foi realizada a 100 V/cm por 60 minutos, com o marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, CA, EUA) para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. Os géis foram visualizados e fotografados conforme descrito anteriormente.

Na PCR para o sequenciamento gênico, foram utilizados 4,0 µL de solução tamponante (10X), 2,0 µL de *Big Dye Terminator*, 1,0 µL de *primer* específico (3,2 pmol/µL), 1,0 µL de DNA purificado e q.s.p. 20,0 µL de água UltraPure. A amplificação foi realizada com 25 ciclos de desnaturação a 96 °C por 30 segundos, hibridização a 50 °C por 15 segundos, extensão a 60 °C por 4 minutos. Os *primers* utilizados em todos os sequenciamentos encontram-se descritos na tabela 3.

Os produtos amplificados foram submetidos à precipitação. Os “amplicons” foram dispensados em tubo de polipropileno de 1,5 mL e adicionados 80 µL de isopropanol 75%. Após incubação por 20 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, a 16000 G, 4°C. Após, o sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas com

1,0 mL de etanol 70%, centrifugadas por 15 minutos a 16000 G, 4°C. O sobrenadante foi totalmente descartado e, após a evaporação completa do etanol, o DNA precipitado foi reconstituído em 10 µL de formamida *high dye* (pH 7,0).

Após precipitado, o DNA foi desnaturado a 95 °C por 2 minutos e levado ao aparelho de sequenciamento 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems-HITACHI) e submetido à eletroforese em capilar. As sequências foram analisadas com auxílio dos programas DS Gene 2.0 (Accelrys, EUA) e BLAST, este último disponível no *site* do NCBI (2012).

Tabela 3 – *Primers* utilizados para as reações de sequenciamento de genes *bla*.

Fragmento amplificado	Primers	Referência
amplificar <i>bla</i> _{CTX-M-grupo 2}	Primer forward: 5'-ATGATGACTCAGAGCATTCG-3' Primer reverse: 5'-TGGGTTACGATTTTCGCCGC-3'	Saladin et al., 2002
sequenciar <i>bla</i> _{CTX-M-grupo 2}	Primer forward: 5'-AGCTGGAAGCCCTGGAGAAAAG-3' Primer reverse: 5'-TTTTCTCCAGGGCTTCCAGC-3' Primer forward: 5'-ATCAAGAAGAGCGACCTGG-3' Primer reverse: 5'-TGATTTCAACGCGCTGATTTAG-3' Primer forward: 5'-CACGCTCAATACCGCCATTC-3' Primer reverse: 5'-AATGGCGGTATTGAGCGTGG-3' Primer forward: 5'-TAGTGGGCGATAAAACCGGCAG-3' Primer reverse: 5'-CTACCCATGATTTTCGGCAGAC-3'	Tollentino et al., 2011
sequenciar <i>bla</i> _{SHV}	Primer forward: 5'-GGGTATTCTTATTTGTTCGC-3' Primer forward: 5'-GAACAGCTGGAGCGAAAGAT-3' Primer forward: 5'-CAGATCGGCGACAACGTCAC-3' Primer forward: 5'-CTGCA GTGGATGGTGGACGA-3' Primer forward: 5'-CCTGCTTGGCCCGAATAACA-3' Primer reverse: 5'-GTGACGTTGTCGCCGATCTG-3' Primer reverse: 5'-ATCTTTCGCTCCAGCTGTC-3' Primer reverse: 5'-TAATTTGCTCAAGCGGCTGC-3'	Rasheed et al., 1997
sequenciar <i>bla</i> _{TEM}	Primer forward: 5'-TCAACATTTTCGTGTTCGC-3' Primer reverse: 5'-AAAGGGAATAAGGGCGACAC-3' Primer forward: 5'-CGTTTTCCAATGATGAGCAC-3' Primer reverse: 5'-TCGGGGCGAAAACCTCTCAAG-3' Primer forward: 5'-CATGAGTGATAACACTGCTGC-3' Primer reverse: 5'-TTGGCAGCAGTGTTATCACTC-3' Primer forward: 5'-ACTACTTACTCTAGCTTCCCG-3' Primer reverse: 5'-TTAATTGTTGCCGGAAGC-3'	Tollentino et al., 2011

3.2.8 Caracterização do ambiente genético de *bla*_{CTX-M}

O DNA total extraído das cepas foi submetido a várias PCR com diferentes pares de *primers* (Tabela 4), a fim de se amplificar as diferentes regiões do integron de classe 1 das cepas onde o mesmo foi detectado. O mesmo protocolo foi desenvolvido para todas as reações. Em tubo de polipropileno de 200 µL, foram adicionados 2 µL de DNA extraído e os reagentes: 2,5 µL de tampão (10X), 2,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,0 µL de dNTP (2,5 mM), 1,0 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 0,2 µL de Taq DNA Polymerase (5 U/µL) e q.s.p. 25 µL de água UltraPure. Os DNA foram submetidos à desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto; após, foram submetidos a uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Os produtos de todas as reações foram analisados em gel de agarose a 1,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL/100 mL), e a eletroforese foi realizada a 100 V/cm por 60 minutos, com o marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas, Life Sciences, MD, EUA) para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. Os géis foram visualizados e fotografados conforme descrito anteriormente.

Tabela 4 – Pares de *primers* utilizados nas PCR e sequenciamento de nucleotídeos para a caracterização do ambiente genético de *bla*_{CTX-M}.

Combinação	Primers	Gene alvo	Referência
Par 1	Primer forward: 5'-ATGAAAGGCTGGCTTTTTCTTG-3' Primer reverse: 5'-CTAGGCATGATCTAACCC-3'	<i>qacEA</i> <i>sulI</i>	Pellegrini et al., 2009
Par 2	Primer forward: 5'-CGTAGAGACGTCGGAATG-3' Primer reverse: 5'-CTAGGCATGATCTAACCC-3'	<i>intI1</i> <i>sulI</i>	Xu et al., 2007 Pellegrini et al., 2009
Par 3	Primer forward: 5'-CACGCTCAATACCGCCATTC-3' Primer reverse: 5'-CTAGGCATGATCTAACCC-3'	final <i>bla</i> _{CTX-M-2} <i>sulI</i>	Tollentino et al., 2011 Pellegrini et al., 2009
Par 4	Primer forward: 5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3' Primer reverse: 5'-CTAGGCATGATCTAACCC-3'	5' CS <i>sulI</i>	Arduino et al., 2002 Pellegrini et al., 2009
Par 5	Primer forward: 5'-CGTAGAGACGTCGGAATG-3' Primer reverse: 5'-ACYTTACTGGTCTGCACAT-3'	<i>intI1</i> início <i>bla</i> _{CTX-M-2}	Xu et al., 2007 Saladin et al., 2002

Abreviações: Y = C ou T; *Tnp* = transposase.

3.2.9 Tipagem molecular

A tipagem molecular pela técnica de ERIC-PCR foi realizada utilizando-se o *primer* descrito na Tabela 1, de acordo com Peng e colaboradores (2007). Em tubo de polipropileno de 200 µL foram adicionados 2,0 µL de DNA extraído e os reagentes: 2,0 µL de tampão (10X), 2,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,0 µL de dNTP (10 mM), 1,0 µL do *primer* (10 pmol/µL), 0,2 µL de Taq DNA Polymerase (5 U/µL) e q.s.p. 25 µL de água UltraPure. O DNA foi inicialmente desnaturado a 94 °C por 5 minutos e submetido a 30 ciclos com as etapas de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 52 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 8 minutos, e extensão final a 72 °C por 16 minutos. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose a 1,5%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL/100 mL). A eletroforese foi realizada a 50 V/cm por 180 minutos, com o marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen, CA, EUA) para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. Os géis foram fotografados conforme descrito anteriormente.

Somente foi possível realizar a ERIC-PCR em 79 isolados, todos cepas “S”, e os padrões de identidade genética gerados pela reação foram analisados com o auxílio do programa BioNumerics (Applied-Maths, Saint-Martens-Latem, Bélgica), baseado no coeficiente de similaridade de Dice e utilizando o método de agrupamento da distância média (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” – UPGMA). Os parâmetros “otimização” e “tolerância de posição das bandas” foram de 0,5% e 1%, respectivamente. De acordo com a literatura (TOLLENTINO et al., 2011), foram consideradas como pertencentes ao mesmo cluster as cepas que apresentaram similaridade igual ou superior a 90%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados Microbiológicos

4.1.1 Estudo Piloto

A avaliação dos resultados obtidos após a análise das amostras de carne resfriada bovina (CRB), carne resfriada de frango (CRF) e carne resfriada suína (CRS) no estudo piloto indicou que o caldo tetracionato (TT) acrescido de 5% de caldo verde brilhante foi o diluente que permitiu recuperar, após a lavagem de superfície, a maior diversidade de morfotipos bacterianos e/ou mais colônias bacterianas com características típicas de *Salmonella* spp.

Também foi observado que a utilização do caldo TT, como meio de enriquecimento seletivo para *Salmonella* spp. após a realização da lavagem superficial, permitiu recuperar maior quantidade de morfotipos típicos do gênero, quando comparado ao caldo RV. Dessa forma, optou-se por utilizar apenas o caldo tetracionato acrescido de 5% de caldo verde brilhante, como diluente para a lavagem superficial da carne, e o caldo TT como diluente de enriquecimento seletivo para *Salmonella* ao longo de todo o estudo.

4.1.2 Detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella* nas amostras de carnes de frango, suína e bovina

Este estudo foi planejado visando à avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em *Escherichia coli* e *Salmonella* isoladas de amostras de carnes de frango, suína e bovina comercializadas em São José do Rio Preto-SP, e a identificação nestes isolados dos genes responsáveis pela produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs). Ao todo, foram isoladas 316 colônias bacterianas. Entretanto, apenas sete isolados (2,2%), obtidos da primeira amostra de CRS (analisada no estudo piloto), tiveram a identificação como *Salmonella* confirmada através da qPCR. Nas demais amostras de carnes avaliadas neste estudo não foram detectados representantes desse taxon.

A amostra de carne onde foi detectada a presença de *Salmonella* foi a única, entre todas as amostras analisadas neste estudo, que foi fracionada e acondicionada em bandeja de isopor pelo estabelecimento comercial. Assim, a manipulação pelos funcionários do estabelecimento pode ter sido a causa da contaminação. De fato, a presença de

microrganismos patogênicos nas mãos de manipuladores de alimentos é conhecida, assim como a possibilidade de transferência dos mesmos aos alimentos (ALMEIDA et al., 1995). Por outro lado, suínos podem carrear cepas de *Salmonella* que podem ser transmitidas para humanos através da cadeia alimentar (KICH et al., 2011).

Apenas oito isolados (2,5%), nenhum deles presuntivamente identificado como “Ec” em ágar EMB, foram confirmados como *Escherichia coli* pelo sistema Vitek 2 Compact. Além disso, alguns isolados presuntivamente identificados como *Escherichia coli* (Ec) foram posteriormente identificados como outras espécies da família Enterobacteriaceae (ver Tabela 6). Todas as oito *E. coli* foram isoladas de CRF. Na Figura 1, são observadas as colônias com morfologia típica de *E. coli* e de *Salmonella* spp. nos diferentes meios de cultura semi-sólidos utilizados para o isolamento e identificação presuntiva.

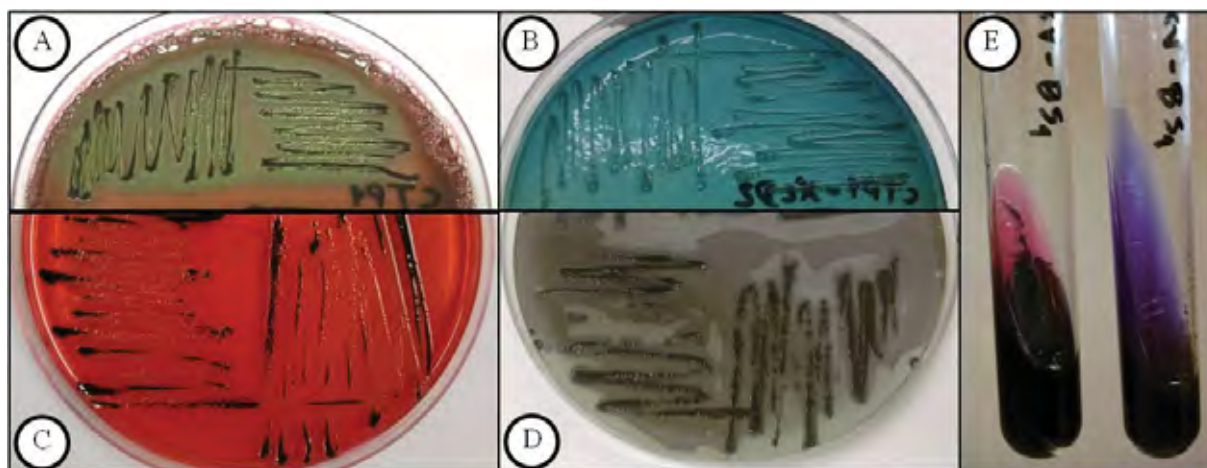


Figura 1 – Características bioquímicas das cepas isoladas em ágar no estudo. [A) Coloração verde-metálica de cepas de *Escherichia coli* em ágar EMB. B) Coloração azul-esverdeada – podendo haver precipitação de H_2S ou não, deixando a colônia com centro negro – de cepas de *Salmonella* em ágar HE. C) Coloração vermelha transparente – podendo haver precipitação de H_2S ou não, deixando a colônia com centro negro – de cepas de *Salmonella* em ágar XLD. D) Coloração marrom a negra de cepas de *Salmonella* em ágar BS. E) Característica dos ágaros TSI – à esquerda – e LIA – à direita – quando inoculados com uma cepa de *Salmonella*.]

As carnes são os principais alimentos responsáveis pela veiculação de patógenos ao homem (ICMSF, 2005), e *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* estão entre os principais patógenos veiculados por produtos cárneos (RHOADES et al., 2009). Durante um estudo que avaliou 68 surtos de doenças transmitidas por alimentos no Noroeste do Estado de São Paulo, 32 (47,06%) foram causados por diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. (PERESI, 2004). Em estudo conduzido pelo Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto-SP (ALMEIDA et al., 2000), a carne e seus derivados foram as principais fontes de *Salmonella* spp. No Rio Grande

do Sul, um estudo avaliou diferentes tipos de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis e revelou que 13,6% dos alimentos continham carne de frango em sua formulação (SANTOS et al., 2002). Um estudo, nos Estados Unidos, determinou *Salmonella* spp. como o agente etiológico mais comumente envolvido (36,0%) em um surto de doenças transmitidas por alimentos registrado em escolas, estando, as carnes, envolvidas entre os alimentos referidos (DANIELS et al., 2002).

No presente estudo, a proporção de cepas de *Salmonella* isoladas não reflete os resultados encontrados em diversos estudos similares, onde é mais frequente. Este resultado pode ser decorrente da metodologia utilizada. No presente trabalho, foram submetidas à identificação específica somente as cepas que apresentaram resistência aos antimicrobianos. Assim, a proporção de 2,2% pode subestimar a quantidade de *Salmonella* realmente presente.

Com relação as *E. coli*, a proporção de 2,5% pode, também, estar subestimada devido à utilização do caldo tetracionato acrescido de 5% de caldo verde-brilhante para a lavagem de superfície e recuperação dos patógenos. Este meio visa uma maior recuperação de *Salmonella*, já que este gênero utiliza o radical tetracionato na cadeia respiratória, favorecendo seu crescimento em detrimento de outras espécies (KAISER & HARDT, 2011).

4.1.3 Suscetibilidade aos antimicrobianos

A Tabela 6 mostra o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos apresentado pelos 316 isolados do estudo. Foram detectados 6 (1,9%) isolados resistentes ao cefepime, 38 (12,0%) isolados resistentes à cefotaxima, 26 (8,2%) resistentes à ceftriaxona e 31 (9,8%) resistentes à ceftazidima (Tabela 6). De fato, o cefepime é uma cefalosporina de quarta geração que apresenta boa atividade “in vitro” contra Enterobacteriaceae produtoras de ESBLs (NOGUEIRA et al., 2011), sendo que, no presente estudo, uma menor quantidade de isolados apresentou resistência a este antimicrobiano, dentre as cefalosporinas de amplo espectro de atividade testadas.

Quatro cepas (S69, S105, Lac4 e Lac82) apresentaram perfil de multirresistência, ou seja, apresentam resistência às três classes de antimicrobianos testadas (beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas), sendo que resistência intermediária a um antimicrobiano, quando na pesquisa de genes de resistência e na prática clínica, é considerada como um fenótipo de resistência (Tabela 6).

Do total de isolados do estudo, 91 (28,8%) foram recuperados a partir de CRB, 168 (53,2%) à partir de CRF, e 57 (18,0%) de CRS. Dos 316 isolados, 53 (16,8%) foram selecionados, devido ao perfil de resistência às drogas β -lactâmicas indicativo da produção de ESBLs, para serem submetidos à identificação automatizada com o sistema Vitek 2 Compact. As espécies identificadas estão descritas na Tabela 6. Dentre as 53 identificadas, 16 (30,2%) foram isoladas a partir de CRB, 27 (50,9%) foram isoladas de CRF, e 10 (18,9%) isoladas de CRS. A Tabela 5 mostra a comparação de cepas isoladas e identificadas a partir dos três tipos de carnes estudadas. Apresenta, também, a relação de quantos isolados bacterianos apresentaram perfil de suscetibilidade indicativo da produção de ESBL dentre as cepas isoladas de cada tipo de carne.

Tabela 5 – Comparação da quantidade de cepas isoladas por tipo de carne.

	Isoladas (%)	Identificadas (%)	Identificadas / Isoladas
CRB	91 (28,8)	16 (30,19)	17,58%
CRF	168 (53,2)	27 (50,94)	16,07%
CRS	57 (18)	10 (18,87)	17,54%
Total	316 (100)	53 (100)	

(%): porcentagem de i isoladas ou identificadas em relação ao total de isoladas ou identificadas.

Entre as cepas identificadas pelo sistema Vitek 2 Compact, 34 (64,1%) foram submetidas aos testes moleculares para a investigação da presença de genes responsáveis pela produção de β -lactamases de espectro estendido (ver seção 4.2.1), com base no fenótipo de resistência às cefalosporinas de terceira geração.

Em algumas cepas observou-se, também, a resistência às quinolonas e/ou aos aminoglicosídeos, associada ou não, à resistência aos β -lactâmicos. A caracterização dos mecanismos de resistência a outras classes de drogas não foi o objetivo deste estudo, mas, devido à sua importância, serão futuramente investigados.

Ainda, vários isolados (S7, S8, S9, S10, S12, S13, S22, S65, S138, S147, S150, Ec4, Ec10, Ec26, Lac1, Lac4, Lac8, Lac10, Lac13, Lac15, Lac20, Lac22 e Lac56) apresentaram resistência aos carbapenêmicos, porém não às cefalosporinas de terceira e quarta geração (Tabela 6), sugerindo alteração na produção de porinas ou de bombas de efluxo como mecanismo de resistência a esses antimicrobianos nestas bactérias. A presença de outros mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos também será futuramente pesquisada.

Tabela 6 – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.

Cepa	Data do Isolamento	Local	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm) *																				Diversidade de genes	Carne fonte de Isolamento	
				AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO	OFX	MXF			NA
				R ? 13	R ? 11	R ? 17	R ? 14	R ? 14	R ? 22	R ? 19	R ? 19	R ? 14	R ? 17	R ? 17	R ? 19	R ? 19	R ? 12	R ? 12	R ? 14	R ? 13	R ? 15	R ? 12	R ? 16			R ? 13
				S ? 18	S ? 15	S ? 21	S ? 18	S ? 18	S ? 26	S ? 23	S ? 23	S ? 18	S ? 21	S ? 21	S ? 23	S ? 23	S ? 15	S ? 15	S ? 17	S ? 20	S ? 21	S ? 16	S ? 20			S ? 19
S1	16/11/2010	A	Salmonella spp.	24	24	24	22	26	30	NT	28	24	26	30	26	26	18	20	17	24	NT	25	23	24	NR	CRS
S2	16/11/2010	A	Salmonella spp.	8	8	26	6	28	30	NT	26	24	24	34	24	28	22	24	22	30	NT	28	25	24	NR	CRS
S3	16/11/2010	A	Salmonella spp.	20	19	24	12	26	28	NT	29	18	24	30	24	26	18	20	16	24	NT	22	23	20	NR	CRS
S4	16/11/2010	A	Salmonella spp.	24	24	22	18	24	28	NT	28	19	24	30	26	26	18	20	17	24	NT	24	22	26	NR	CRS
S5	16/11/2010	A	Salmonella Rinsen	26	25	22	24	26	30	NT	28	22	26	30	25	24	18	20	18	26	NT	24	24	24	NR	CRS
S6	16/11/2010	A	Salmonella spp.	24	24	24	22	26	30	NT	30	24	24	30	26	30	18	20	18	28	NT	26	24	23	NR	CRS
S7	16/11/2010	A	Salmonella spp.	6	10	23	6	25	30	NT	30	14	26	30	20	18	20	22	18	30	NT	24	24	28	NR	CRS
S8	14/03/2011	A	Proteus mirabilis	22	17	32	18	26	27	30	28	21	27	37	18	16	19	22	19	19	11	14	9	6	NR	CRF
S9	14/03/2011	A	Morganella morganii	6	12	23	6	24	27	30	24	14	27	34	16	16	22	24	19	27	26	26	25	22	NR	CRF
S10	14/03/2011	A	Proteus mirabilis	25	18	24	16	24	30	30	29	24	27	34	18	20	20	24	17	16	7	16	10	6	NR	CRF
S11	14/03/2011	A	Proteus mirabilis	13	13	25	6	11	11	18	12	21	24	26	16	20	15	18	19	12	14	10	6	bla _{CTX-M-2}	CRF	
S12	14/03/2011	A	Proteus mirabilis	22	22	24	24	24	31	28	36	22	20	34	22	18	18	22	6	24	12	19	16	6	NR	CRF
S13	14/03/2011	A	Providencia stuartii	10	12	20	8	24	30	25	22	22	25	36	20	18	16	19	20	26	26	25	25	24	NR	CRF
S14	14/03/2011	A	NR	6	14	22	6	30	24	24	26	24	18	26	30	26	18	8	18	30	NT	28	26	26	NR	CRF
S15	14/03/2011	A	NR	26	23	26	24	30	30	30	34	24	26	32	28	24	18	19	18	34	NT	32	30	23	NR	CRF
S16	04/04/2011	A	Enterobacter cloacae	6	18	22	6	28	24	23	25	6	20	26	30	24	16	18	14	30	NT	29	24	20	NR	CRB
S17	04/04/2011	A	NR	6	12	22	6	28	23	24	28	6	20	28	24	26	18	20	18	30	NT	30	28	24	NR	CRB
S18	04/04/2011	A	NR	29	23	24	20	28	28	24	29	12	23	26	24	28	20	23	18	30	NT	29	26	26	NR	CRB
S19	04/04/2011	A	NR	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NR	CRB
S20	04/04/2011	A	NR	8	18	24	12	28	28	26	30	6	24	28	28	28	18	22	18	30	NT	28	24	24	NR	CRB
S21	04/04/2011	A	NR	16	23	20	15	29	27	24	28	6	22	28	27	24	18	18	18	30	NT	26	26	22	NR	CRB
S22	04/04/2011	A	NR	8	9	24	6	28	24	23	28	6	22	24	14	26	18	18	18	28	NT	26	28	24	NR	CRB
S23	04/04/2011	A	Citrobacter freundii	8	6	17	6	26	9	10	13	6	8	12	12	26	18	20	20	30	NT	28	28	26	bla _{GES-like}	CRB
S24	04/04/2011	A	NR	6	8	18	6	26	14	12	14	6	6	18	18	24	18	18	18	34	NT	30	30	24	NR	CRB
S25	04/04/2011	A	Enterobacter cloacae complex	10	7	17	6	26	12	12	13	6	8	13	12	24	18	22	18	30	NT	27	28	24	NR	CRB
S26	04/04/2011	A	NR	6	17	26	6	32	24	26	28	20	18	30	24	24	22	24	22	34	NT	32	32	26	NR	CRB
S27	25/04/2011	B	NR	28	24	30	18	34	34	30	25	22	30	35	26	28	22	22	23	NT	NT	30	23	18	NR	CRB
S28	25/04/2011	B	NR	30	28	34	24	38	40	36	42	24	24	44	30	24	20	26	24	40	NT	40	38	24	NR	CRB
S29	25/04/2011	B	NR	28	25	30	24	34	36	36	44	18	30	38	26	22	24	28	18	40	NT	38	36	6	NR	CRB
S30	25/04/2011	B	NR	18	24	28	24	30	32	36	42	24	28	34	24	22	24	26	20	44	NT	NT	36	23	NR	CRF

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.																										
Cepa	Data do Isolamento	Local	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm) *																		Diversidade de genes	Carne fonte de Isolamento			
				AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO			OFX	MXF ^a	NA
				R ? 13 S ? 18	R ? 11 S ? 15	R ? 17 S ? 21	R ? 14 S ? 18	R ? 14 S ? 18	R ? 22 S ? 26	R ? 19 S ? 23	R ? 19 S ? 23	R ? 14 S ? 18	R ? 17 S ? 21	R ? 17 S ? 21	R ? 19 S ? 23	R ? 19 S ? 23	R ? 12 S ? 15	R ? 12 S ? 15	R ? 14 S ? 17	R ? 13 S ? 17	R ? 15 S ? 21			R ? 12 S ? 16	R ? 16 S ? 20	R ? 13 S ? 19
S31	25/04/2011	B	NR	36	24	34	30	38	38	36	44	24	30	36	28	28	24	28	23	46	NT	42	38	22	NR	CRF
S32	25/04/2011	B	NR	30	26	36	24	40	48	36	42	24	36	36	32	24	20	22	22	34	NT	32	30	18	NR	CRF
S33	25/04/2011	B	NR	24	18	30	18	34	36	30	36	24	30	36	30	24	24	26	24	36	NT	30	30	24	NR	CRB
S34	25/04/2011	B	NR	28	26	30	20	30	34	30	36	24	32	32	24	NT	22	26	24	30	NT	28	24	24	NR	CRB
S35	25/04/2011	B	<i>Citrobacter freundii</i>	9	12	23	6	34	23	22	21	11	19	25	30	28	24	26	24	32	NT	30	29	25	NR	CRS
S36	25/04/2011	B	<i>Citrobacter youngae</i>	6	8	20	6	30	11	11	12	8	11	18	28	24	23	24	24	32	NT	30	28	24	bla _{SHV} -like	CRS
S37	25/04/2011	B	<i>Morganella morganii</i>	6	13	24	6	34	18	19	24	18	18	28	32	28	24	28	24	34	NT	32	30	29	NR	CRS
S38	25/04/2011	B	<i>Morganella morganii</i>	6	11	28	6	35	24	20	NT	14	22	28	30	23	24	24	20	26	NT	28	26	24	NR	CRS
S39	25/04/2011	B	<i>Morganella morganii</i>	6	7	30	6	38	26	26	30	17	24	32	30	23	28	30	28	36	NT	34	30	30	NR	CRF
S40	25/04/2011	B	<i>Morganella morganii</i>	8	12	24	6	34	23	22	NT	18	22	28	29	20	22	24	26	30	NT	28	24	26	NR	CRS
S41	25/04/2011	B	NR	14	18	28	13	34	30	23	NT	20	28	30	30	26	24	24	30	NT	26	28	22	NR	CRB	
S42	25/04/2011	B	NR	26	20	29	28	36	36	28	NT	28	32	36	33	30	26	28	28	32	NT	28	28	24	NR	CRB
S43	25/04/2011	B	NR	28	26	32	24	33	36	30	NT	34	24	36	30	26	23	25	23	32	NT	28	28	22	NR	CRB
S44	25/04/2011	B	NR	12	22	29	14	35	33	28	29	17	29	32	34	30	26	24	25	30	NT	26	28	24	NR	CRF
S45	25/04/2011	B	NR	10	22	28	12	35	34	24	30	6	29	36	34	25	23	26	25	35	NT	32	30	28	NR	CRF
S46	25/04/2011	B	NR	20	19	26	12	34	34	26	30	12	29	35	32	28	24	26	24	30	NT	28	29	24	NR	CRF
S47	25/04/2011	B	NR	26	22	28	24	34	34	28	34	26	30	36	34	30	24	25	23	32	NT	28	30	25	NR	CRS
S48	25/04/2011	B	NR	12	20	26	8	32	32	26	28	12	24	33	32	26	22	23	20	26	NT	25	23	20	NR	CRS
S49	25/04/2011	B	NR	6	6	26	11	28	29	24	29	6	6	30	15	26	22	24	18	23	NT	17	12	20	NR	CRF
S50	25/04/2011	B	NR	13	18	24	12	30	28	24	28	11	24	22	30	26	22	23	20	23	NT	24	20	19	NR	CRF
S51	25/04/2011	B	<i>Citrobacter youngae</i>	11	20	25	14	34	6	6	10	6	29	34	34	26	23	24	23	23	NT	23	20	19	bla _{SHV} -like	CRF
S52	25/04/2011	B	NR	24	22	30	21	32	34	30	36	22	33	38	30	25	24	26	20	36	NT	34	30	24	NR	CRF
S53	25/04/2011	B	NR	24	22	28	10	30	34	28	36	23	32	36	29	23	22	25	23	34	NT	32	26	22	NR	CRF
S54	25/04/2011	B	NR	12	18	23	18	30	26	22	25	6	23	24	30	22	17	12	19	25	NT	15	18	16	NR	CRB
S55	25/04/2011	B	NR	26	24	29	20	31	18	14	36	22	32	38	31	24	24	22	20	34	NT	32	28	23	NR	CRB
S56	25/04/2011	B	NR	22	9	34	24	34	38	32	40	18	35	40	34	25	22	26	24	34	NT	32	26	21	NR	CRB
S57	25/04/2011	B	NR	23	22	30	18	29	34	23	35	22	30	30	30	23	22	26	23	32	NT	34	28	22	NR	CRB
S58	25/04/2011	B	NR	6	12	26	6	30	28	23	21	6	26	28	28	22	20	16	18	25	NT	29	24	11	NR	CRS
S59	11/07/2011	C	NR	18	12	26	16	32	32	26	30	12	28	32	28	30	18	23	23	26	18	NT	19	17	NR	CRS
S60	11/07/2011	C	NR	30	16	35	24	34	NT	36	40	24	32	NT	34	30	20	24	26	38	NT	NT	32	24	NR	CRB

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.																										
Cepa	Data do Isolamento	Local	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm) *																		Diversidade de genes	Carne fonte de Isolamento			
				AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO			OFX	MXF ^a	NA
				R ? 13 S ? 18	R ? 11 S ? 15	R ? 17 S ? 21	R ? 14 S ? 18	R ? 14 S ? 18	R ? 22 S ? 26	R ? 19 S ? 23	R ? 19 S ? 23	R ? 14 S ? 18	R ? 17 S ? 21	R ? 17 S ? 21	R ? 19 S ? 23	R ? 19 S ? 23	R ? 12 S ? 15	R ? 12 S ? 15	R ? 14 S ? 17	R ? 13 S ? 17	R ? 15 S ? 21			R ? 12 S ? 16	R ? 16 S ? 20	R ? 13 S ? 19
S61	11/07/2011	C	NR	16	23	28	13	30	NT	26	30	13	28	NT	30	29	20	24	23	30	NT	NT	24	23	NR	CRB
S62	11/07/2011	C	NR	26	26	36	6	14	36	32	36	24	30	42	30	30	23	24	22	32	29	NT	30	24	NR	CRB
S63	11/07/2011	C	NR	9	17	25	12	28	30	25	28	6	27	31	28	26	20	NT	21	30	31	NT	NT	23	NR	CRB
S64	11/07/2011	C	NR	8	16	25	10	30	30	24	28	6	25	30	26	24	18	NT	19	28	28	NT	NT	21	NR	CRB
S65	11/07/2011	C	NR	6	24	28	16	34	32	26	30	6	24	32	14	29	23	24	24	28	24	NT	26	18	NR	CRB
S66	11/07/2011	C	NR	26	24	30	20	36	34	30	34	28	30	34	30	32	20	23	22	30	24	NT	24	20	NR	CRB
S67	11/07/2011	C	NR	16	19	26	12	30	30	24	30	6	26	28	30	25	23	20	20	32	28	30	30	24	NR	CRB
S68	11/07/2011	C	<i>Citrobacter freundii</i>	6	6	18	6	26	14	9	10	6	6	17	18	24	23	18	23	29	28	30	28	23	<i>bla</i> _{SHV-like}	CRB
S69	11/07/2011	C	<i>Serratia marcescens</i>	6	6	24	6	28	24	14	24	6	24	28	20	24	16	11	6	25	18	20	17	23	NR	CRB
S70	11/07/2011	C	NR	6	10	28	6	24	6	27	30	16	30	36	30	28	26	24	25	30	25	29	26	26	NR	CRB
S71	11/07/2011	C	NR	6	6	28	6	35	30	26	30	18	32	34	24	24	23	20	24	28	24	26	23	24	NR	CRB
S72	11/07/2011	C	NR	29	22	30	26	36	36	30	34	30	30	36	30	34	22	24	24	32	31	NT	30	28	NR	CRB
S73	11/07/2011	C	NR	24	20	26	26	34	36	26	32	26	32	36	30	32	20	24	24	28	NT	NT	28	20	NR	CRB
S74	11/07/2011	C	NR	30	18	32	26	36	38	30	36	30	34	40	32	36	20	24	22	20	NT	NT	23	25	NR	CRB
S75	11/07/2011	C	NR	26	18	30	25	36	NT	6	34	30	32	NT	32	32	20	24	24	32	NT	NT	30	26	NR	CRB
S76	11/07/2011	C	NR	24	16	32	28	40	42	32	36	30	36	42	34	36	20	24	20	32	NT	NT	30	30	NR	CRB
S77	11/07/2011	C	NR	28	20	30	17	35	36	30	30	26	32	36	30	30	20	24	23	40	NT	NT	34	30	NR	CRB
S78	11/07/2011	C	NR	16	19	24	12	34	30	25	30	6	24	30	25	24	24	23	23	29	25	28	25	24	NR	CRB
S79	11/07/2011	C	NR	16	9	25	12	28	30	22	26	20	24	26	26	26	23	23	22	30	24	25	26	24	NR	CRB
S80	11/07/2011	C	NR	30	28	36	26	36	NT	36	34	26	12	NT	32	32	23	28	24	38	NT	NT	34	24	NR	CRB
S81	11/07/2011	C	NR	28	22	36	24	38	40	36	42	28	34	46	32	34	22	24	23	36	30	30	23	NR	CRB	
S82	11/07/2011	C	NR	6	24	26	26	30	NT	32	36	24	30	NT	30	32	20	24	24	36	NT	NT	30	24	NR	CRB
S83	11/07/2011	C	NR	30	28	35	24	36	36	32	38	25	35	44	30	30	24	25	22	34	29	30	30	24	NR	CRB
S84	11/07/2011	C	NR	30	26	35	28	34	NT	35	26	28	17	NT	34	30	22	25	24	38	NT	NT	32	26	NR	CRB
S85	11/07/2011	C	NR	28	26	34	26	30	NT	30	36	24	32	NT	30	28	22	24	23	40	NT	NT	34	26	NR	CRB
S86	11/07/2011	C	<i>Citrobacter freundii</i>	20	23	30	20	23	36	29	32	26	32	32	32	36	20	24	23	32	32	30	30	24	NR	CRB
S87	11/07/2011	C	NR	23	24	30	22	33	36	29	37	23	30	36	27	24	24	25	22	34	28	32	30	26	NR	CRB
S88	11/07/2011	C	<i>Citrobacter youngae</i>	6	6	18	6	26	6	9	8	6	8	14	24	24	22	23	23	26	23	24	23	22	<i>bla</i> _{TEM-1}	CRS
S89	11/07/2011	C	NR	16	16	26	12	34	29	24	29	6	28	31	30	25	23	24	23	24	24	24	24	20	NR	CRS
S90	11/07/2011	C	NR	7	12	26	6	30	24	18	30	6	26	18	24	26	24	24	24	30	30	30	30	24	NR	CRS

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.																										
Cepa	Data do Isolamento	Local	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm) *																		Diversidade de genes	Carne fonte de Isolamento			
				AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO			OFX	MXF	NA
				R ≤ 13 S ≥ 18	R ≤ 11 S ≥ 15	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 22 S ≥ 26	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 13 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 21			R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 16 S ≥ 20	R ≤ 13 S ≥ 19
S91	11/07/2011	C	NR	24	17	26	22	30	NT	26	30	23	26	NT	30	30	18	24	16	30	29	NT	26	25	NR	CRS
S92	11/07/2011	C	NR	6	20	26	24	34	34	28	32	26	30	35	29	30	22	24	23	32	29	29	30	23	NR	CRS
S93	11/07/2011	C	NR	26	19	26	24	32	32	28	34	28	30	34	29	35	18	24	22	28	28	NT	28	22	NR	CRS
S94	23/08/2011	D	<i>Escherichia coli</i>	8	6	20	6	27	22	20	24	12	17	19	24	28	21	NT	19	22	19	NT	NT	6	NR	CRF
S95	23/08/2011	D	NR	24	14	26	21	30	32	25	30	24	24	32	28	30	24	NT	24	27	27	NT	NT	21	NR	CRF
S96	23/08/2011	D	NR	24	12	28	16	30	35	30	30	24	30	30	28	30	20	NT	22	34	34	NT	30	30	NR	CRF
S97	23/08/2011	D	NR	7	10	28	6	30	30	25	30	6	28	32	20	22	20	NT	20	30	30	NT	27	24	NR	CRF
S98	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S96																		NR	CRF			
S99	23/08/2011	D	NR	6	6	30	16	32	36	29	38	10	31	38	24	24	20	NT	22	35	34	NT	NT	35	NR	CRF
S100	23/08/2011	D	NR	18	20	24	8	30	29	23	28	23	26	30	29	29	22	NT	22	28	26	NT	NT	22	NR	CRF
S101	23/08/2011	D	NR	12	6	24	6	30	32	20	28	21	28	36	23	27	18	NT	22	30	30	NT	26	32	NR	CRF
S102	23/08/2011	D	<i>Aeromonas sobria</i>	14	6	30	6	32	34	28	36	24	30	36	18	22	18	NT	20	36	36	NT	30	35	NR	CRF
S103	23/08/2011	D	NR	32	28	36	28	34	39	33	39	26	34	38	32	30	22	NT	21	36	NT	NT	NT	22	NR	CRF
S104	23/08/2011	D	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	12	22	18	28	30	24	28	22	24	28	26	29	18	NT	18	18	15	NT	16	12	NR	CRF
S105	23/08/2011	D	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	6	20	6	13	10	9	9	25	20	17	22	26	10	NT	20	20	16	NT	16	16	<i>bla</i> _{CTX-M-2/SHV-11/TEM-1}	CRF
S106	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S105																		NR	CRF			
S107	23/08/2011	D	NR	8	19	24	6	29	29	24	28	6	26	30	26	21	18	NT	18	30	26	NT	NT	21	NR	CRF
S108	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S107																		NR	CRF			
S109	23/08/2011	D	<i>Citrobacter freundii</i>	20	23	6	14	30	30	24	29	14	26	30	34	26	26	NT	22	24	21	NT	NT	6	NR	CRF
S110	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S109																		NR	CRF			
S111	23/08/2011	D	NR	32	26	30	30	32	36	30	36	25	30	36	30	24	22	NT	21	36	NT	NT	NT	21	NR	CRF
S112	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S111																		NR	CRF			
S113	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S105																		NR	CRF			
S114	23/08/2011	D	NR	28	27	34	22	34	36	32	38	26	34	40	32	28	22	NT	22	36	28	NT	NT	22	NR	CRF
S115	23/08/2011	D	NR	28	23	12	6	32	34	30	35	30	32	36	35	32	20	NT	23	30	30	NT	NT	28	NR	CRF
S116	23/08/2011	D	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	13	18	6	16	14	12	13	24	17	22	22	29	18	NT	20	24	24	NT	NT	22	<i>bla</i> _{SHV-2}	CRF
S117	23/08/2011	D	NR	24	23	30	22	30	36	30	36	24	30	36	30	23	22	NT	21	19	NT	NT	NT	6	NR	CRF
S118	23/08/2011	D	NR	20	22	28	8	31	32	26	30	29	30	32	29	30	20	NT	22	26	26	NT	NT	24	NR	CRF
S119	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S118																		NR	CRF			
S120	23/08/2011	D	NR	23	18	29	6	30	32	29	32	30	30	36	29	29	18	NT	20	30	29	NT	NT	28	NR	CRF

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.																										
Cepa	Data do Isolamento	Local	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (nm) *																				Diversidade de genes	Carne fonte de Isolamento	
				AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO	OFX	MXF ^a			NA
				R ≤ 13 S ≥ 18	R ≤ 11 S ≥ 15	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 22 S ≥ 26	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 13 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 21	R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 16 S ≥ 20			R ≤ 13 S ≥ 19
S121	23/08/2011	D	NR	24	22	28	25	30	36	30	36	30	34	34	36	32	22	NT	22	30	32	NT	NT	28	NR	CRF
S122	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S121																				NR	CRF	
S123	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S121																				NR	CRF	
S124	23/08/2011	D	NR	27	27	32	30	36	36	30	36	32	36	38	36	32	22	NT	21	30	NT	NT	NT	27	NR	CRF
S125	23/08/2011	D	NR	28	20	30	18	28	34	26	32	30	30	32	34	30	20	NT	19	30	NT	NT	NT	24	NR	CRF
S126	23/08/2011	D	NR	15	6	30	30	36	38	34	38	36	32	38	22	23	21	NT	22	30	25	NT	NT	6	NR	CRF
S127	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S126																				NR	CRF	
S128	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S124																				NR	CRF	
S129	23/08/2011	D	NR	14	7	30	14	34	34	NT	34	26	30	38	30	32	21	NT	22	32	28	30	26	8	NR	CRF
S130	23/08/2011	D	NR	11	18	30	12	36	36	30	34	8	26	36	34	28	22	NT	22	32	32	NT	NT	26	NR	CRF
S131	23/08/2011	D	NR	24	19	25	21	34	36	NT	30	24	26	28	30	30	20	NT	20	26	NT	NT	NT	22	NR	CRF
S132	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S131																				NR	CRF	
S133	23/08/2011	D	NR	24	23	36	30	34	36	30	36	32	32	36	36	36	22	NT	20	24	17	NT	NT	6	NR	CRF
S134	23/08/2011	D	NR	12	6	25	24	30	32	24	35	30	26	36	21	20	18	NT	18	24	NT	NT	NT	6	NR	CRF
S135	23/08/2011	D	NR	16	10	28	16	34	36	NT	38	22	31	36	28	26	20	NT	21	34	32	32	30	34	NR	CRF
S136	23/08/2011	D	NR	11	12	30	6	36	32	27	30	26	26	36	33	32	24	NT	25	36	NT	NT	NT	30	NR	CRF
S137	23/08/2011	D	Escherichia coli	16	10	26	6	18	15	14	14	29	26	21	32	32	22	NT	22	30	30	NT	NT	22	bla _{CTX-M-2-like} /TEM-1	CRF
S138	23/08/2011	D	NR	9	6	26	6	32	32	23	30	25	28	32	18	21	20	NT	20	24	NT	NT	NT	6	NR	CRF
S139	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S137																				NR	CRF	
S140	23/08/2011	D	NR	12	24	30	18	36	36	28	32	14	30	34	36	27	24	NT	24	32	30	NT	NT	28	NR	CRF
S141	23/08/2011	D	NR	26	24	30	18	30	34	NT	36	24	32	36	30	26	21	NT	21	34	30	33	30	22	NR	CRF
S142	23/08/2011	D	NR	28	24	32	18	33	36	NT	36	24	32	39	34	26	21	NT	22	38	32	36	34	24	NR	CRF
S143	23/08/2011	D	Escherichia coli	23	23	30	20	34	33	NT	30	27	30	34	34	30	22	NT	22	24	22	20	22	8	NR	CRF
S144	23/08/2011	D	NR	10	12	30	6	32	26	NT	25	18	24	32	30	28	23	NT	24	36	30	32	32	24	NR	CRF
S145	23/08/2011	D	NR	15	19	27	8	35	30	NT	27	21	26	32	33	30	21	NT	22	30	30	30	28	25	NR	CRF
S146	23/08/2011	D	NR	28	26	32	24	34	37	NT	36	24	33	38	32	28	21	NT	21	36	28	32	28	21	NR	CRF
S147	23/08/2011	D	Aeromonas sobria	14	6	24	25	32	36	NT	36	30	30	36	18	19	20	NT	21	23	18	22	17	6	NR	CRF
S148	23/08/2011	D	NR	28	26	35	29	36	40	NT	38	25	35	42	32	29	20	NT	20	36	30	36	30	22	NR	CRF
S149	23/08/2011	D	Proteus mirabilis	26	24	30	20	32	36	NT	36	24	32	36	30	24	22	NT	22	24	12	18	14	6	NR	CRF
S150	23/08/2011	D	NR	18	8	25	26	32	36	NT	41	34	30	36	21	19	20	NT	22	29	26	26	24	7	NR	CRF

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.																										
Cepa	Data do Isolamento	Local	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm) *																		Diversidade de genes	Carne fonte de isolamento			
				AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO			OFX	MXF ^a	NA
				R ≤ 13 S ≥ 18	R ≤ 11 S ≥ 15	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 22 S ≥ 26	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 13 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 21			R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 16 S ≥ 20	R ≤ 13 S ≥ 19
S151	23/08/2011	D	NR	24	22	24	20	32	32	NT	30	25	28	30	30	28	13	NT	18	25	26	24	23	22	NR	CRF
S152	23/08/2011	D	NR	29	29	32	22	32	36	NT	38	24	32	36	30	24	14	NT	19	23	12	18	13	6	NR	CRF
S153	23/08/2011	D	NR	16	7	19	6	34	36	NT	36	24	30	36	24	24	23	NT	24	24	24	23	22	10	NR	CRF
S154	23/08/2011	D	NR	28	26	34	22	34	36	NT	36	24	36	40	32	26	21	NT	21	34	30	32	30	23	NR	CRF
S155	23/08/2011	D	NR	26	26	35	22	34	36	NT	36	22	32	38	32	26	20	NT	20	34	30	32	30	20	NR	CRF
S156	23/08/2011	D	NR	24	24	30	24	32	36	NT	36	24	32	36	30	24	20	NT	20	34	28	32	30	21	NR	CRF
S157	23/08/2011	D	NR	26	25	32	26	34	36	NT	36	24	32	38	32	26	21	NT	22	35	29	31	29	21	NR	CRF
S158	23/08/2011	D	NR	23	23	31	14	34	35	NT	34	26	32	34	36	32	20	NT	21	12	8	12	14	6	NR	CRF
S159	23/08/2011	D	NR	16	8	27	10	32	36	NT	38	30	32	36	26	27	21	NT	22	30	28	28	24	6	NR	CRF
S160	23/08/2011	D	NR	28	27	36	28	35	38	NT	38	24	34	40	34	28	20	NT	20	36	29	32	30	21	NR	CRF
S161	23/08/2011	D	NR	24	18	24	22	34	32	NT	32	26	28	32	30	26	20	NT	20	26	26	26	24	21	NR	CRF
S162	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S161																		NR	CRF			
S163	23/08/2011	D	NR	25	12	24	18	34	32	NT	30	26	26	30	35	30	20	NT	22	24	26	24	22	22	NR	CRF
S164	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S163																		NR	CRF			
S165	23/08/2011	D	NR	25	24	30	23	30	35	NT	35	23	30	35	30	25	19	NT	20	32	28	30	28	18	NR	CRF
S166	23/08/2011	D	NR	22	22	30	20	34	32	NT	32	24	30	33	34	30	21	NT	22	32	30	30	30	20	NR	CRF
S167	23/08/2011	D	NR	27	26	34	26	34	38	NT	38	26	34	39	32	26	20	NT	20	34	30	34	32	22	NR	CRF
S168	23/08/2011	D	NR	28	28	34	24	36	38	NT	38	24	34	40	32	26	22	NT	21	34	28	30	30	19	NR	CRF
S169	23/08/2011	D	NR	22	22	28	19	34	34	NT	30	26	30	34	32	26	18	NT	22	22	20	22	7	NR	CRF	
S170	23/08/2011	D	NR	22	22	28	17	32	32	NT	30	27	28	30	34	30	23	NT	21	22	18	19	20	6	NR	CRF
S171	23/08/2011	D	NR	29	28	34	26	33	36	NT	36	25	33	38	32	26	21	NT	20	34	29	32	29	22	NR	CRF
S172	23/08/2011	D	NR	27	26	34	25	35	38	NT	36	24	33	38	32	29	21	NT	20	35	30	32	30	22	NR	CRF
S173	23/08/2011	D	NR	27	26	32	26	34	37	NT	37	24	32	38	30	24	19	NT	19	35	30	31	29	20	NR	CRF
S174	23/08/2011	D	NR	24	23	30	22	32	35	NT	35	19	30	36	30	21	18	NT	17	35	28	34	30	22	NR	CRF
S175	23/08/2011	D	NR	27	27	34	27	35	38	NT	37	24	33	40	32	28	21	NT	22	34	30	32	30	22	NR	CRF
S176	23/08/2011	D	NR	28	26	34	28	34	38	NT	38	26	33	38	32	26	21	NT	21	34	28	34	32	20	NR	CRF
S177	23/08/2011	D	NR	28	26	34	30	36	40	NT	40	26	34	40	30	24	20	NT	20	32	28	32	30	20	NR	CRF
S178	23/08/2011	D	<i>Escherichia coli</i>	24	24	28	20	32	32	NT	30	28	30	34	32	28	22	NT	22	25	20	20	7	NR	CRF	
S179	23/08/2011	D	NR	30	26	32	20	32	34	NT	32	24	32	34	36	34	24	NT	25	34	36	32	34	28	NR	CRF
S180	23/08/2011	D	NR	Mesma cepa que S179																		NR	CRF			

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.																										
Cepa	Data do Isolamento	Local	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm) *																		Diversidade de genes	Carne fonte de Isolamento			
				AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO			OFX	MXF*	NA
				R ≤ 13 S ≥ 18	R ≤ 11 S ≥ 15	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 22 S ≥ 26	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 13 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 21			R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 16 S ≥ 20	R ≤ 13 S ≥ 19
S181	23/08/2011	D	NR	26	26	36	24	36	40	NT	40	24	34	38	32	26	20	NT	18	36	26	34	30	20	NR	CRF
S182	23/08/2011	D	NR	30	30	36	24	36	40	NT	40	26	38	44	32	30	18	NT	18	34	28	34	32	21	NR	CRF
S183	23/08/2011	D	Escherichia coli	22	22	30	18	36	34	NT	32	26	30	32	36	30	22	NT	22	24	19	19	21	6	NR	CRF
S184	23/08/2011	D	NR	28	26	30	22	34	36	NT	38	24	33	38	32	24	19	NT	19	38	32	36	32	24	NR	CRF
S185	23/08/2011	D	NR	28	27	34	24	34	38	NT	38	24	34	40	32	28	21	NT	22	36	30	32	30	18	NR	CRF
S186	23/08/2011	D	NR	19	16	27	12	30	32	NT	32	25	30	32	32	30	19	NT	19	23	20	22	24	14	NR	CRF
Ec1	16/11/2010	A	NR	22	22	30	18	30	30	NT	30	14	26	32	26	28	20	22	22	30	NT	30	24	22	NR	CRS
Ec2	16/11/2010	A	NR	22	24	30	18	32	34	NT	30	12	26	32	28	28	18	20	22	30	NT	34	30	26	NR	CRS
Ec3	16/11/2010	A	NR	24	24	28	28	32	30	NT	34	16	28	32	30	30	20	22	24	30	NT	30	26	26	NR	CRS
Ec4	14/03/2011	A	NR	9	13	23	NT	25	28	23	25	7	25	NT	19	21	18	23	20	27	20	25	25	19	NR	CRF
Ec5	14/03/2011	A	NR	12	16	26	15	26	28	25	28	9	28	32	20	21	22	24	19	25	26	25	25	19	NR	CRF
Ec6	14/03/2011	A	NR	19	18	26	17	24	25	25	28	22	25	30	24	25	20	19	20	29	27	30	28	24	NR	CRF
Ec7	14/03/2011	A	NR	12	22	25	12	25	28	29	27	12	28	34	24	20	19	20	21	35	28	34	32	26	NR	CRF
Ec8	14/03/2011	A	NR	18	17	23	16	25	26	26	27	21	26	30	21	20	18	20	18	28	27	26	26	25	NR	CRF
Ec9	14/03/2011	A	NR	8	16	25	18	24	26	25	24	10	24	32	24	20	20	20	20	28	26	26	26	24	NR	CRF
Ec10	14/03/2011	A	NR	16	18	24	13	28	26	26	25	20	23	31	19	20	18	27	28	26	26	26	19	NR	CRF	
Ec11	04/04/2011	A	NR	21	11	20	18	30	28	23	28	22	26	30	26	29	17	18	20	24	NT	26	21	18	NR	CRB
Ec12	04/04/2011	A	NR	14	20	25	11	31	29	25	30	9	26	31	26	26	19	18	20	28	NT	26	24	23	NR	CRB
Ec13	04/04/2011	A	NR	14	18	24	6	32	32	26	30	10	27	32	26	26	19	20	24	32	NT	30	26	22	NR	CRB
Ec14	04/04/2011	A	NR	13	18	26	6	34	32	28	33	11	30	34	28	24	19	20	23	30	NT	29	27	22	NR	CRB
Ec15	04/04/2011	A	NR	13	23	25	12	32	28	24	30	6	26	30	28	26	18	18	19	28	NT	18	24	16	NR	CRB
Ec16	04/04/2011	A	NR	14	20	23	11	32	28	24	28	10	24	28	26	24	16	19	20	26	NT	26	24	18	NR	CRB
Ec17	04/04/2011	A	NR	20	22	24	10	31	28	24	28	8	24	30	27	26	NT	18	18	28	NT	24	24	21	NR	CRB
Ec18	04/04/2011	A	NR	18	18	24	6	30	26	24	26	10	24	30	24	30	NT	18	19	24	NT	22	18	20	NR	CRB
Ec19	04/04/2011	A	NR	14	20	26	12	34	30	25	30	8	28	30	32	24	22	23	23	27	NT	29	26	24	NR	CRB
Ec20	04/04/2011	A	NR	18	20	26	12	32	30	26	30	9	28	31	26	27	NT	22	22	30	NT	30	24	24	NR	CRB
Ec21	04/04/2011	A	NR	12	20	26	12	30	26	24	30	8	24	30	24	24	NT	14	6	24	12	30	19	7	NR	CRB
Ec22	04/04/2011	A	NR	20	22	27	16	30	30	28	30	24	27	34	27	26	15	18	12	22	NT	24	24	22	NR	CRB
Ec23	04/04/2011	A	NR	16	22	24	14	32	30	24	28	6	28	25	32	24	23	24	24	29	NT	28	24	22	NR	CRB
Ec24	04/04/2011	A	NR	7	17	24	6	30	25	22	25	6	24	30	21	24	17	18	17	18	NT	22	20	10	NR	CRB

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.																										
Cepa	Data do Isolamento	Local	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm) *																		Diversidade de genes	Carne fonte de isolamento			
				AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO			OFX	MXF ²	NA
				R ≤ 13 S ≥ 18	R ≤ 11 S ≥ 15	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 22 S ≥ 26	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 13 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 21			R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 16 S ≥ 20	R ≤ 13 S ≥ 19
Ec25	04/04/2011	A	NR	9	18	24	10	30	28	24	30	8	23	28	25	26	20	19	19	27	NT	28	28	19	NR	CRB
Ec26	04/04/2011	A	NR	7	10	24	6	28	26	23	25	6	24	29	16	22	20	18	17	20	NT	14	16	10	NR	CRB
Ec27	25/04/2011	B	<i>Citrobacter braakii</i>	6	10	19	6	30	16	12	12	6	15	12	16	21	17	18	19	26	6	24	20	23	NR	CRB
Ec28	25/04/2011	B	<i>Citrobacter braakii</i>	6	6	19	6	31	24	17	16	6	19	24	14	26	16	21	20	24	6	24	21	22	NR	CRB
Ec29	25/04/2011	B	<i>Citrobacter freundii</i>	8	8	24	12	26	31	23	25	6	18	25	22	24	16	20	20	24	14	22	22	23	NR	CRB
Ec30	25/04/2011	B	NR	12	18	27	12	28	30	24	30	6	28	30	25	30	18	23	18	30	12	25	22	23	NR	CRB
Ec31	25/04/2011	B	NR	16	20	25	14	31	30	26	30	8	24	28	24	29	16	18	18	27	22	27	23	24	NR	CRF
Ec32	25/04/2011	B	<i>Citrobacter diversus</i>	13	19	25	12	26	24	22	14	7	26	24	12	24	18	19	20	30	28	26	24	24	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	CRF
Ec33	25/04/2011	B	<i>Citrobacter freundii</i>	6	6	26	6	NT	25	20	23	6	23	17	18	24	17	18	19	28	NT	26	20	10	NR	CRF
Ec34	25/04/2011	B	NR	10	20	24	11	30	28	27	30	6	26	18	22	27	17	17	18	32	NT	29	25	25	NR	CRF
Ec35	25/04/2011	B	<i>Citrobacter braakii</i>	6	6	22	6	34	22	10	9	6	16	22	14	30	20	22	26	35	34	34	32	28	NR	CRF
Ec36	25/04/2011	B	NR	26	26	30	32	38	38	34	36	24	30	32	26	36	22	25	28	32	30	30	28	29	NR	CRS
Ec37	25/04/2011	B	NR	12	16	26	6	26	28	24	28	6	24	28	21	24	18	18	20	24	NT	22	22	16	NR	CRS
Ec38	25/04/2011	B	NR	18	22	26	20	30	30	28	30	24	28	30	24	30	18	22	22	30	30	30	30	24	NR	CRS
Ec39	25/04/2011	B	NR	6	18	24	6	32	28	24	26	6	24	28	22	25	18	22	22	30	28	26	30	22	NR	CRS
Ec40	25/04/2011	B	NR	24	20	30	24	30	32	28	32	24	24	30	28	32	24	24	26	28	30	24	24	26	NR	CRS
Ec41	25/04/2011	B	NR	12	22	30	6	30	32	28	30	6	24	28	24	30	18	18	22	30	26	30	28	26	NR	CRS
Ec42	25/04/2011	B	NR	14	13	22	16	28	28	22	28	14	24	24	20	30	18	18	24	24	22	22	20	18	NR	CRB
Ec43	11/07/2011	C	NR	11	26	32	14	40	36	30	32	8	30	36	26	32	25	29	28	38	38	NT	34	30	NR	CRS
Ec44	11/07/2011	C	NR	16	24	30	15	36	35	30	30	14	32	36	30	33	24	26	26	36	36	NT	30	22	NR	CRS
Ec45	11/07/2011	C	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	8	18	6	22	7	7	10	10	10	14	16	26	23	23	20	29	26	27	28	24	<i>bla</i> _{SHV-like}	CRB
Lac1	16/11/2010	A	NR	10	10	26	6	28	26	NT	24	20	18	26	19	26	20	22	18	30	NT	28	24	24	NR	CRS
Lac2	16/11/2010	A	NR	18	18	24	12	28	30	NT	28	18	22	26	22	28	14	18	16	26	NT	26	26	22	NR	CRS
Lac3	16/11/2010	A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	22	25	18	28	30	NT	30	22	30	32	28	29	18	20	18	11	NT	8	10	6	NR	CRS
Lac4	16/11/2010	A	<i>Raoultella planticola</i>	20	20	26	15	28	30	NT	30	22	24	24	18	26	6	16	16	14	NT	10	10	6	NR	CRS
Lac5	16/11/2010	A	NR	20	20	28	22	30	30	NT	28	24	26	30	24	30	18	20	18	28	NT	26	26	24	NR	CRS
Lac6	16/11/2010	A	NR	22	20	26	22	28	30	NT	28	22	26	30	22	26	18	20	18	26	NT	26	24	22	NR	CRS
Lac7	14/03/2011	A	NR	8	10	23	6	28	24	22	27	6	27	30	23	25	19	18	20	26	NT	26	24	20	NR	CRF
Lac8	04/04/2011	A	NR	7	15	24	10	30	28	24	27	6	26	30	24	18	19	19	20	30	NT	28	24	22	NR	CRB
Lac9	04/04/2011	A	<i>Citrobacter braakii</i>	8	6	13	6	20	6	6	6	6	6	11	16	22	19	21	21	27	NT	26	24	21	NR	CRB

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.			Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm) *																				Diversidade de genes	Carne fonte de Isolamento		
Cepa	Data do	Local	Identidade	AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO	OFX			MXF ^a	NA
	Isolamento			R ≤ 13 S ≥ 18	R ≤ 11 S ≥ 15	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 22 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 13 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 21	R ≤ 12 S ≥ 16			R ≤ 16 S ≥ 20	R ≤ 13 S ≥ 19
Lac10	25/04/2011	B	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	6	6	26	6	34	30	24	24	6	28	36	13	20	22	24	22	30	28	30	24	30	NR	CRB
Lac11	25/04/2011	B	<i>Citrobacter freundii</i>	6	18	26	12	32	30	NT	30	6	24	28	20	NT	20	20	22	26	6	NT	24	18	<i>bla_{SHV-like}/bla_{GES-like}</i>	CRB
Lac12	25/04/2011	B	<i>Providencia rettgeri</i>	6	10	22	6	30	28	22	28	18	22	28	18	24	18	18	22	26	24	22	24	16	NR	CRF
Lac13	25/04/2011	B	NR	6	6	26	6	26	28	24	28	16	26	28	18	24	18	18	20	26	22	26	24	24	NR	CRF
Lac14	25/04/2011	B	NR	12	12	30	6	36	36	32	36	14	34	36	20	30	22	22	26	32	28	30	28	24	NR	CRF
Lac15	25/04/2011	B	NR	24	18	28	6	36	34	26	32	18	28	32	18	30	18	18	20	30	25	26	24	20	NR	CRS
Lac16	11/07/2011	C	NR	12	18	28	14	34	34	28	34	6	30	35	29	26	22	23	23	34	30	30	32	24	NR	CRS
Lac17	11/07/2011	C	<i>Citrobacter braakii</i>	6	6	12	6	28	10	12	14	6	11	18	24	24	22	24	23	35	30	32	30	24	NR	CRS
Lac18	11/07/2011	C	NR	18	20	29	14	30	30	28	30	7	30	34	29	24	24	24	22	35	32	34	36	28	NR	CRS
Lac19	11/07/2011	C	NR	16	18	29	12	30	30	28	30	6	30	35	26	24	23	22	23	34	32	35	32	28	NR	CRS
Lac20	11/07/2011	C	NR	19	12	26	20	30	30	24	32	24	28	25	18	24	20	22	20	26	22	23	26	20	NR	CRS
Lac21	11/07/2011	C	NR	11	28	32	16	40	38	30	35	10	32	40	32	32	26	30	30	40	38	36	36	27	NR	CRS
Lac22	11/07/2011	C	<i>Citrobacter freundii</i>	10	14	23	6	36	30	25	30	6	28	34	26	17	18	24	22	22	18	19	19	6	NR	CRS
Lac23	11/07/2011	C	NR	12	22	28	12	32	32	26	30	6	28	34	26	26	22	24	24	26	26	NT	24	23	NR	CRS
Lac24	11/07/2011	C	NR	22	6	28	24	36	36	28	34	22	32	36	30	30	20	24	24	30	30	28	28	22	NR	CRS
Lac25	11/07/2011	C	NR	28	22	30	6	34	36	30	36	26	36	40	32	36	22	NT	24	30	NT	NT	28	22	NR	CRS
Lac26	11/07/2011	C	NR	30	18	32	27	36	36	30	36	30	36	40	32	36	18	24	22	34	NT	NT	30	30	NR	CRS
Lac27	11/07/2011	C	NR	23	19	30	27	36	36	28	35	26	32	40	30	30	20	24	23	30	28	NT	28	22	NR	CRS
Lac28	11/07/2011	C	NR	22	18	24	22	29	NT	24	29	20	26	NT	30	30	22	24	24	30	NT	NT	30	24	NR	CRS
Lac29	11/07/2011	C	NR	28	24	30	26	34	36	29	35	12	32	36	30	35	22	25	24	34	NT	NT	30	26	NR	CRS
Lac30	11/07/2011	C	NR	26	18	28	24	34	34	26	32	26	30	34	28	30	20	24	22	30	23	NT	28	20	NR	CRS
Lac31	11/07/2011	C	NR	18	13	26	16	30	NT	26	30	8	28	NT	30	30	18	11	20	30	30	NT	30	24	NR	CRS
Lac32	11/07/2011	C	NR	16	20	28	12	34	32	28	30	12	30	32	29	32	20	20	22	30	32	NT	32	24	NR	CRS
Lac33	11/07/2011	C	NR	28	24	30	28	36	36	30	36	30	34	36	32	36	22	24	22	30	NT	NT	30	28	NR	CRB
Lac34	11/07/2011	C	<i>Citrobacter freundii</i>	10	19	30	11	36	34	28	30	6	6	36	30	16	22	24	23	36	NT	NT	30	24	NR	CRB
Lac35	11/07/2011	C	NR	12	24	30	12	34	34	30	30	8	28	34	28	28	20	24	23	30	30	NT	28	24	NR	CRB
Lac36	11/07/2011	C	NR	14	18	26	13	30	NT	25	28	6	25	NT	30	26	18	NT	24	22	NT	NT	18	22	NR	CRB
Lac37	11/07/2011	C	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	6	6	22	6	30	13	11	14	6	15	14	20	24	18	23	24	35	30	30	30	24	NR	CRB
Lac38	11/07/2011	C	NR	23	6	24	20	29	NT	26	30	22	28	NT	30	30	18	20	23	26	NT	NT	28	20	NR	CRB
Lac39	11/07/2011	C	NR	28	18	30	26	36	35	28	34	28	34	36	28	32	23	24	24	32	32	NT	30	28	NR	CRB

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.																										
Cepa	Data do Isolamento	Local	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm) *																		Diversidade de genes	Carne fonte de Isolamento			
				AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO			OFX	MXF ^a	NA
				R ≤ 13 S ≥ 18	R ≤ 11 S ≥ 15	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 22 S ≥ 26	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 13 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 21			R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 16 S ≥ 20	R ≤ 13 S ≥ 19
Lac40	11/07/2011	C	NR	24	20	28	24	36	36	30	36	28	30	36	30	34	20	24	22	30	30	26	28	22	NR	CRB
Lac41	11/07/2011	C	NR	24	18	26	18	32	NT	30	32	29	20	NT	30	28	22	24	24	32	NT	NT	30	24	NR	CRB
Lac42	11/07/2011	C	NR	11	24	30	10	36	34	30	31	6	30	35	29	29	22	22	24	32	35	NT	34	27	NR	CRB
Lac43	11/07/2011	C	Enterobacter cloacae	8	18	24	9	32	30	24	25	8	12	32	26	28	20	25	21	32	31	NT	31	24	NR	CRB
Lac44	11/07/2011	C	NR	11	24	28	11	30	NT	26	32	6	30	35	27	28	18	24	22	30	NT	NT	30	22	NR	CRB
Lac45	11/07/2011	C	NR	6	NT	28	13	33	30	26	28	14	26	31	27	28	18	20	21	28	24	NT	24	24	NR	CRB
Lac46	11/07/2011	C	NR	17	19	30	12	34	NT	30	30	18	32	NT	30	28	22	24	24	36	NT	NT	34	28	NR	CRB
Lac47	23/08/2011	D	NR	14	6	26	27	33	34	NT	NT	30	30	36	20	21	20	NT	20	26	26	26	23	6	NR	CRF
Lac48	23/08/2011	D	NR	8	12	27	6	30	30	NT	30	6	29	32	28	22	20	NT	20	32	30	30	30	22	NR	CRF
Lac49	23/08/2011	D	NR	22	20	26	17	32	31	NT	30	24	28	30	32	28	20	NT	20	22	20	19	22	7	NR	CRF
Lac50	23/08/2011	D	NR	27	24	33	26	33	36	NT	36	24	32	38	30	26	20	NT	20	36	29	32	29	20	NR	CRF
Lac51	23/08/2011	D	NR	26	25	32	24	32	36	NT	36	24	31	37	30	24	20	NT	NT	34	29	30	26	20	NR	CRF
Lac52	23/08/2011	D	NR	20	18	29	17	32	33	NT	32	23	30	34	30	28	22	NT	20	35	32	30	34	24	NR	CRF
Lac53	23/08/2011	D	NR	24	23	29	26	34	34	NT	31	29	30	34	32	31	22	NT	23	32	30	30	26	24	NR	CRF
Lac54	23/08/2011	D	NR	20	17	25	16	32	32	NT	30	28	28	30	34	30	22	NT	23	22	20	18	20	6	NR	CRF
Lac55	23/08/2011	D	Escherichia coli	14	12	23	6	18	16	NT	14	25	24	22	29	26	20	NT	20	22	16	18	16	10	bla _{TEM-1}	CRF
Lac56	23/08/2011	D	NR	14	7	26	18	30	32	NT	36	24	28	34	19	18	18	NT	20	24	22	23	20	6	NR	CRF
Lac57	23/08/2011	D	NR	17	11	29	12	36	38	NT	38	30	34	37	26	22	21	NT	21	36	34	34	30	34	NR	CRF
Lac58	23/08/2011	D	NR	18	9	30	28	34	36	NT	40	34	31	38	28	32	19	NT	21	26	25	24	22	6	NR	CRF
Lac59	23/08/2011	D	NR	18	25	30	16	36	34	NT	33	10	31	34	34	28	22	NT	22	32	30	30	30	24	NR	CRF
Lac60	23/08/2011	D	Escherichia coli	18	10	28	6	15	10	NT	10	28	24	16	30	30	22	NT	22	20	14	17	17	6	bla _{CTX-M-2}	CRF
Lac61	23/08/2011	D	Escherichia coli	17	10	26	6	15	10	NT	9	28	24	17	28	30	23	NT	22	18	14	16	16	6	NR	CRF
Lac62	23/08/2011	D	NR	28	28	33	26	36	40	NT	40	27	36	40	32	26	21	NT	21	36	32	36	30	21	NR	CRF
Lac63	23/08/2011	D	NR	28	28	34	24	34	38	NT	38	26	34	38	34	26	20	NT	22	36	30	34	30	22	NR	CRF
Lac64	23/08/2011	D	NR	23	20	29	20	35	35	NT	34	30	31	34	35	30	21	NT	22	34	30	31	30	22	NR	CRF
Lac65	23/08/2011	D	NR	22	20	28	20	34	35	NT	34	29	30	34	35	30	22	NT	22	32	30	30	29	20	NR	CRF
Lac66	23/08/2011	D	NR	32	31	40	24	38	38	NT	41	24	38	43	32	29	21	NT	22	34	30	30	30	22	NR	CRF
Lac67	23/08/2011	D	NR	26	24	34	20	32	36	NT	40	24	34	40	34	24	20	NT	20	35	32	36	36	23	NR	CRF
Lac68	23/08/2011	D	NR	18	16	26	17	34	34	NT	32	26	30	32	34	30	22	NT	20	30	29	30	29	22	NR	CRF
Lac69	23/08/2011	D	NR	19	15	29	14	36	36	NT	34	24	30	35	32	30	22	NT	23	33	32	31	30	24	NR	CRF

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.

Tabela 6 (Continuação) – Suscetibilidade aos antimicrobianos, diversidade genotípica e origem das cepas isoladas no estudo.																										
Cepa	Data do Isolamento	Local	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm) *																			Diversidade de genes	Carne fonte de Isolamento		
				AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO	OFX			MXF ^a	NA
				R ≤ 13	R ≤ 11	R ≤ 17	R ≤ 14	R ≤ 14	R ≤ 22	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 14	R ≤ 17	R ≤ 17	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 12	R ≤ 12	R ≤ 14	R ≤ 13	R ≤ 15	R ≤ 12			R ≤ 16	R ≤ 13
				S ≥ 18	S ≥ 15	S ≥ 21	S ≥ 18	S ≥ 18	S ≥ 26	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 18	S ≥ 21	S ≥ 21	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 15	S ≥ 15	S ≥ 17	S ≥ 17	S ≥ 21	S ≥ 16			S ≥ 20	S ≥ 19
Lac70	23/08/2011	D	NR	29	28	35	24	35	38	NT	38	26	36	42	32	26	20	NT	20	36	30	35	30	24	NR	CRF
Lac71	23/08/2011	D	NR	28	26	35	22	36	38	NT	38	25	36	40	34	28	21	NT	21	36	30	34	30	22	NR	CRF
Lac72	23/08/2011	D	NR	20	19	30	16	33	33	NT	32	23	31	34	30	30	22	NT	22	36	34	30	34	28	NR	CRF
Lac73	23/08/2011	D	NR	20	22	28	14	30	32	NT	30	22	25	30	30	30	21	NT	20	32	32	32	34	23	NR	CRF
Lac74	23/08/2011	D	NR	22	22	28	21	34	33	NT	33	27	28	33	34	30	20	NT	21	32	30	31	30	21	NR	CRF
Lac75	23/08/2011	D	NR	21	20	26	18	32	32	NT	32	28	30	32	32	29	22	NT	21	30	28	30	27	19	NR	CRF
Lac76	23/08/2011	D	NR	28	26	34	22	36	38	NT	39	25	34	40	31	24	20	NT	20	26	30	36	33	20	NR	CRF
Lac77	23/08/2011	D	NR	24	24	30	23	31	32	NT	32	18	30	36	30	18	17	NT	17	32	30	30	27	24	NR	CRF
Lac78	23/08/2011	D	NR	19	16	28	17	32	33	NT	30	24	28	30	34	30	23	NT	23	30	29	29	30	20	NR	CRF
Lac79	23/08/2011	D	NR	22	19	29	20	34	35	NT	32	29	30	32	32	30	22	NT	22	34	29	30	29	20	NR	CRF
Lac80	23/08/2011	D	NR	23	22	22	20	32	33	NT	30	29	29	30	31	29	20	NT	20	30	30	30	29	22	NR	CRF
Lac81	23/08/2011	D	NR	23	22	28	21	35	35	NT	34	29	30	34	36	30	22	NT	23	35	32	32	31	24	NR	CRF
Lac82	23/08/2011	D	NR	18	13	26	14	32	32	NT	32	22	30	34	35	31	11	NT	22	8	6	6	6	6	NR	CRF
Lac83	23/08/2011	D	NR	18	16	30	18	36	36	NT	35	29	32	36	36	34	22	NT	22	34	34	34	30	24	NR	CRF
Lac84	23/08/2011	D	NR	18	14	29	17	36	34	NT	34	26	30	35	36	30	21	NT	22	31	30	30	29	24	NR	CRF
Lac85	23/08/2011	D	NR	18	14	26	16	34	32	NT	32	28	30	34	34	30	21	NT	20	32	30	30	30	24	NR	CRF

* De acordo com CLSI (2008; 2011).

^a Determinação do halo de suscetibilidade de acordo com EUCAST (2011).

Local: estabelecimento comercial onde foi obtida a amostra de carne

AK: amicacina; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CN: gentamicina; CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima; EFT: ceftiofur; ENO: enrofloxacin; ETP: ertapenem; FEP: cefepima; FOX: ceftiofur; IPM: imipenem; KF: cefalotina; LEV: levofloxacin; MXF: moxifloxacin; NA: ácido nalidixico; OFX: ofloxacin; SAM: ampicilina/sulbactam; TOB: tobramicina; TZP: piperacilina/tazobactam.

NR: teste não realizado ou inconclusivo. NT: antibiótico não testado. “Mesma cepa”: cepas com o mesmo perfil de ERIC-PCR.

R: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano (números marcados em vermelho); S: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano (números marcados em preto); valores intermediários a R e S indicam resistência intermediária ao antimicrobiano (números marcados em verde).

4.2 Resultados Moleculares

4.2.1 Genes de resistência aos β -lactâmicos

Após a análise dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentados pelos 316 isolados do estudo, 34 (10,76%) foram selecionados e submetidos aos ensaios para a detecção de genes de resistência às drogas β -lactâmicas (genes *bla*). Em 14/34 cepas (41,18%) foram detectados um ou mais genes tipo *bla* (Tabela 6), sendo que, destas, sete cepas (50%) apresentaram *bla*_{SHV} (S36, S51, S68, S105, S116, Ec45 e Lac11), duas cepas (14,28%) apresentaram *bla*_{GES} (S23 e Lac11), quatro cepas (28,57%) apresentaram *bla*_{TEM} (S88, S105, S137 e Lac55) e cinco cepas (35,71%) apresentaram *bla*_{CTX-M} (S11, S105, S137, Ec32 e Lac60).

4.2.1.1 Detecção e caracterização de *bla*_{SHV}

As Figuras 2 e 3 demonstram a detecção do gene *bla*_{SHV} nas cepas S36, S51, S68, S105, S116, Ec45 e Lac11, através da visualização do fragmento de 861pb, correspondente à região codificadora do gene, e a Tabela 7 mostra o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dessas cepas. Apesar de as cepas S36 (*Citrobacter youngae*), S51 (*C. youngae*) e Lac11 (*Citrobacter freundii*) apresentarem duas bandas inespecíficas além da banda de 861 pb (Figura 2), as mesmas foram consideradas carreadoras de *bla*_{SHV} pelo fato de a banda esperada se apresentar fortemente no gel de agarose, indicando grande quantidade deste “amplicon” na amostra. Já a cepa S68 (*C. freundii*) apresenta, nitidamente, uma única banda com o tamanho esperado, e a cepa Ec45 (*Enterobacter cloacae*) apresenta uma banda de 861 pb fraca no gel, porém única, sendo considerada também como positiva na detecção deste gene. Já as cepas S105 e S116, ambas *Klebsiella pneumoniae*, apresentaram a banda correspondente ao gene *bla*_{SHV} na multiplex-PCR, embora a banda de S116 esteja muito mais nítida que a de S105, talvez, mesmo, pelo fato de a primeira ter amplificado um único gene, enquanto a segunda tenha amplificado três diferentes genes (Figura 3).

O sequenciamento do *bla*_{SHV} detectado na cepa S105 revelou tratar-se de *bla*_{SHV-11}, que codifica uma β -lactamase diferente de SHV-1 por apenas uma substituição de leucina por glutamina na posição 35 (NÜESCH-INDERBINEN et al., 1997), e apresenta um espectro restrito (MORRIS et al., 2003). Na cepa S116 identificou-se o gene *bla*_{SHV-2}, que codifica SHV-2, a primeira ESBP descrita (KNOTHE et al., 1983). SHV-2 diferencia-se de SHV-1 por

apenas uma substituição de glicina por serina na posição 238, e promove resistência a todas as cefalosporinas de amplo espectro e ao aztreonam (JACOBY & CARRERAS, 1990), embora S116 apresente suscetibilidade a este último (Tabela 7).

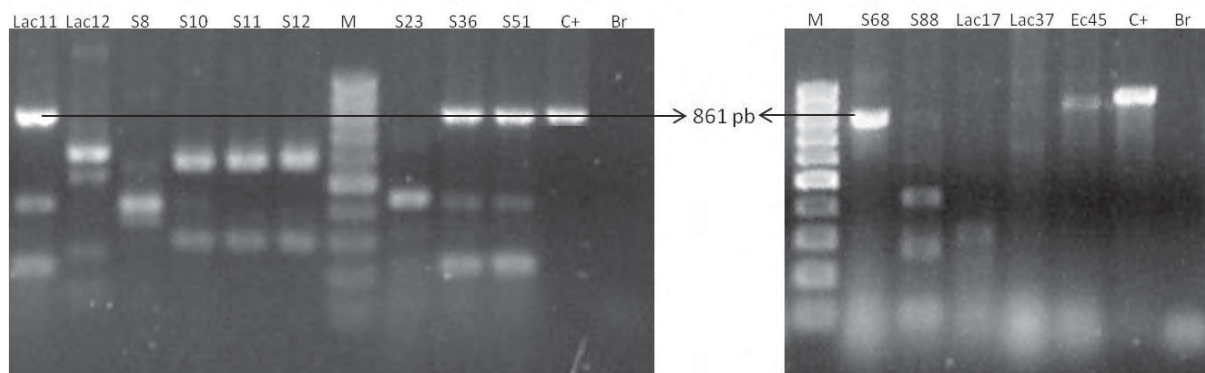


Figura 2 – Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene *bla*_{SHV}. [M: marcador de peso molecular de 100 pb. C+: controle positivo da reação. Br: controle negativo da reação.]

A detecção de genes da família *bla*_{SHV} em diversas Enterobacteriaceae isoladas de animais de produção tem sido descrita, tal como em *E. coli* isoladas de animais doentes na Espanha (BRIÑAS et al., 2005); em amostras fecais de porcos na China e na Espanha (BRIÑAS et al., 2005; TIAN et al., 2009); em cepas de *E. coli* em amostras de carne na Tunísia (JOUINI et al., 2007) e em carne de frango na Holanda (LAVERSTEIN-VAN HALL et al., 2011); e cepas de *Salmonella* em amostras de aves e de suas carnes na Holanda (HASMAN et al., 2005).

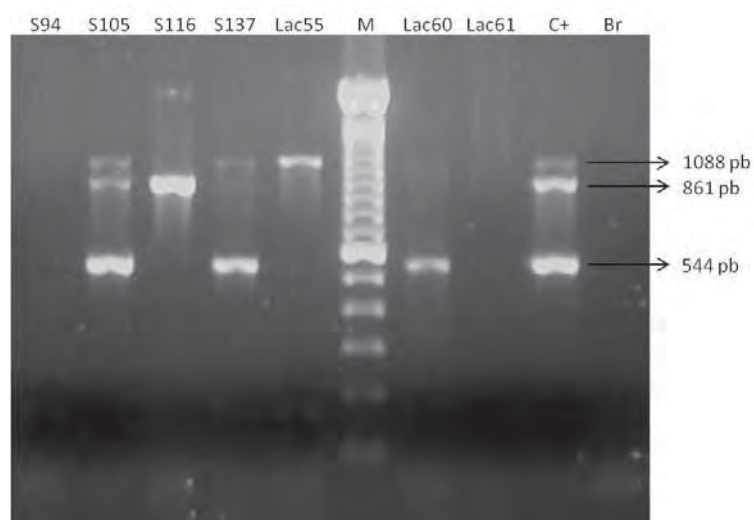


Figura 3 – Gel de eletroforese da multiplex-PCR para detecção dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}. [M: marcador de peso molecular de 100 pb. C+: controle positivo da reação. Br: controle negativo da reação.]

Após a primeira detecção, os genes *bla_{SHV}* não amplificaram, novamente, nas cepas S23, S36, S51, S68, Ec45 e Lac11, o que inviabilizou seu sequenciamento.

As duas cepas que tiveram o seu *bla_{SHV}* sequenciado (S105 e S116) foram identificadas como *K. pneumoniae*, reconhecida como um importante agente de infecções relacionadas à assistência à saúde e comunitárias, além de ser considerada o principal reservatório de genes de resistência dentre as Enterobacteriaceae. Esta bactéria coloniza os tratos respiratório e intestinal de humanos e causa pneumonia, bacteremia e meningite (LEVINSON & JAWETZ, 2005). Recentemente, esta bactéria tem emergido como um importante patógeno causador de abscessos hepáticos piogênicos primários (PAN et al., 2008), e algumas cepas têm sido relacionadas a infecções intestinais e diarreia em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos (THI et al., 2003).

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados S36, S51, S68 e Ec45, sugere a produção de ao menos uma ESBL (Tabela 7). Pelo fato de não terem sido detectados outros genes nestes isolados, provavelmente os *bla_{SHV}* detectados são codificadores de ESBL, e o sequenciamento dos mesmos elucidará a questão.

Tabela 7 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene *bla_{SHV}*.

Isolado	S36	S51	S68	S105	S116	Ec45	Lac11
Espécie	<i>C. youngae</i>	<i>C. youngae</i>	<i>C. freundii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>C. freundii</i>
Antimicrobianos	AMC (13/18)	6	11	6	14	15	6
	SAM (11/15)	8	20	6	6	13	18
	TZP (17/21)	20	25	18	20	18	26
	KF (14/18)	6	14	6	6	6	12
	FEP (14/18)	30	34	26	13	16	32
	CTX (22/26)	11	6	14	10	14	7
	EFT (19/23)	11	6	9	9	12	7
	CRO (19/23)	12	10	10	9	13	10
	FOX (14/18)	8	6	6	25	24	10
	CAZ (17/21)	11	29	6	20	17	10
	ATM (17/21)	18	34	17	17	22	14
	ETP (19/23)	28	34	18	22	22	16
	IPM (19/23)	24	26	24	26	29	26
	CN (12/15)	23	23	23	10	18	23
	TOB (12/15)	24	24	18	NT	NT	23
	AK (14/17)	24	23	23	20	20	20
	LEV (13/17)	32	23	29	20	24	29
	ENO (15/21)	NT	NT	28	16	24	26
	OFX (12/16)	30	23	30	18	NT	27
	MXF (16/20)	28	20	28	16	NT	28
	NA (13/19)	24	19	23	16	22	24

NT: antimicrobiano não testado. Números marcados em vermelho: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano testado. Números marcados em preto: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano testado. Números marcados em verde: tamanho do halo que indica resistência intermediária ao antimicrobiano testado.

4.2.1.2 Detecção e caracterização de *bla*_{GES}

Duas cepas apresentaram genes da família *bla*_{GES}. As cepas S23 (*C. freundii*) e Lac11 (*C. freundii*) apresentaram, claramente, a banda de 864 pb, correspondente à região codificadora do gene, apesar de ter havido a amplificação de outras bandas inespecíficas (Figura 4). A cepa Ec32 apresentou uma banda muito fraca no gel de agarose além de outras bandas inespecíficas; portanto, decidiu-se não considerá-la portadora de *bla*_{GES} (Figura 4).

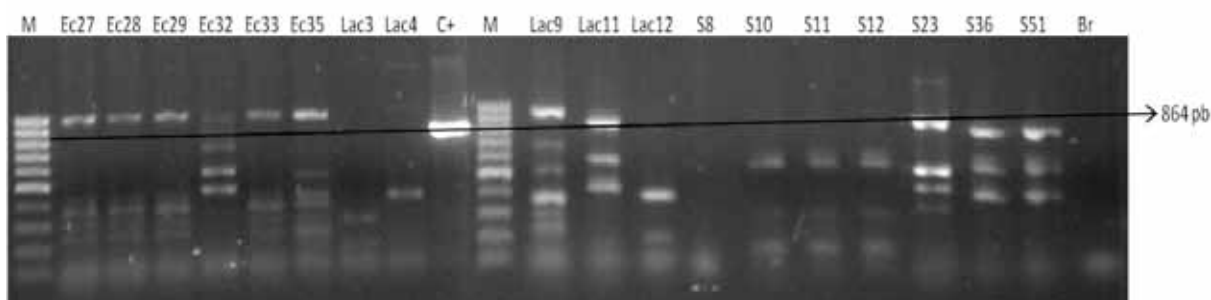


Figura 4 – Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene *bla*_{GES}. [M: marcador de peso molecular de 100 pb. C+: controle positivo da reação. Br: controle negativo da reação.]

Até o momento, não existe na literatura nenhum relato da detecção de genes *bla*_{GES-like} em cepas bacterianas isoladas de qualquer tipo de carne destinada ao consumo humano. A cepa S23 apresenta um perfil de resistência aos β -lactâmicos sugestivo da produção de uma ESBL, sendo sensível apenas ao cefepime e ao imipenem (Tabela 8), o que condiz com a possível produção de uma enzima do tipo GES. Este achado é preocupante sob o ponto de vista de saúde pública, já que o gene pode ser transmitido facilmente a outras bactérias patogênicas. Além disso, duas cepas de *C. freundii* carreadoras de *bla*_{GES} foram isoladas de CRB adquiridas em dias e estabelecimentos distintos, o que indica a disseminação deste gene em carnes destinadas ao consumo humano.

A cepa Lac11, carreadora de *bla*_{GES}, também apresentou um gene *bla*_{SHV} (Figura 4). A co-existência de *bla*_{GES} e *bla*_{SHV} foi previamente descrita em uma *Klebsiella pneumoniae* isolada durante um estudo clínico realizado na República da Coréia, cuja cepa era produtora das enzimas GES-5 e SHV-12 (JEONG et al., 2005). O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos em Lac11 mostrou resistência somente à cefalotina, à cefoxitina e à combinação amoxicilina/ácido clavulânico (Tabela 8). Este perfil de resistência era esperado, já que o isolado corresponde a uma cepa de *C. freundii* e, nesta espécie, a hiperprodução de AmpC é responsável pela resistência a cefalosporinas e inibidores das β -lactamases (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Tabela 8 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene *bla_{GES}*.

	Isolado	S23	Lac11
	Espécie	<i>C. freundii</i>	<i>C. freundii</i>
Antimicrobianos	AMC (13/18)	8	6
	SAM (11/15)	6	18
	TZP (17/21)	17	26
	KF (14/18)	6	12
	FEP (14/18)	26	32
	CTX (22/26)	9	30
	EFT (19/23)	10	NT
	CRO (19/23)	13	30
	FOX (14/18)	6	6
	CAZ (17/21)	8	24
	ATM (17/21)	12	28
	ETP (19/23)	12	20
	IPM (19/23)	26	NT
	CN (12/15)	18	20
	TOB (12/15)	20	20
	AK (14/17)	20	22
	LEV (13/17)	30	26
	ENO (15/21)	NT	6
	OFX (12/16)	28	NT
	MXF (16/20)	28	24
	NA (13/19)	26	18

NT: antimicrobiano não testado. Números marcados em vermelho: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano testado. Números marcados em preto: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano testado. Números marcados em verde: tamanho do halo que indica resistência intermediária ao antimicrobiano testado.

O alto nível de sensibilidade aos antimicrobianos apresentado pela cepa Lac11, mesmo na presença de genes que conferem resistência aos β -lactâmicos pode ser explicado i) pelo fato de as proteínas não estarem sendo codificadas e, ainda, o gene *bla_{SHV}* detectado não ser codificador de β -lactamases de espectro estendido, como o *bla_{SHV-1}*, por exemplo; ou ii) estes genes podem estar localizados em uma região distante do promotor do integron, o que resulta em baixo nível de expressão (COLLIS & HALL, 1995).

Os dois genes *bla_{GES}* detectados também não puderam ser sequenciados devido à sua não amplificação posteriormente à primeira vez.

4.2.1.3 Detecção e caracterização de *bla_{TEM}*

O gene *bla_{TEM-1}* foi detectado nas cepas S88 (*C. youngae*), S105 (*K. pneumoniae*), S137 (*Escherichia coli*) e Lac 55 (*E. coli*) (Figuras 3 e 5). TEM-1 é uma β -lactamase de espectro restrito, frequentemente detectada em bactérias isoladas de amostras clínicas humanas. Nos últimos anos, a produção de β -lactamases tipo TEM por bactérias isoladas de animais tem sido relatada, como em *P. mirabilis* isolados de produtos cárneos, em *E. coli*

isoladas de bezerros com doença diarreica (BRADFORD et al., 1999; KIM et al., 2005), em vários sorotipos de *S. enterica* isoladas de aves e humanos na Bélgica e França (CLOECKAERT et al., 2007), e em *E. coli* isoladas de carnes de frango na Holanda (LAVERSTEIN-VAN HALL et al., 2011).

Os dois isolados de *E. coli* que apresentaram o gene *bla*_{TEM-1}, bem como o isolado de *K. pneumoniae*, foram recuperados de uma mesma amostra de CRF (Tabela 6) e, embora esse gene não seja causador de um perfil de resistência às cefalosporinas de terceira geração, sua presença em cepas possivelmente patogênicas isoladas de alimentos é preocupante pelo fato de este gene poder sofrer mutações que resultem na expressão de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs).

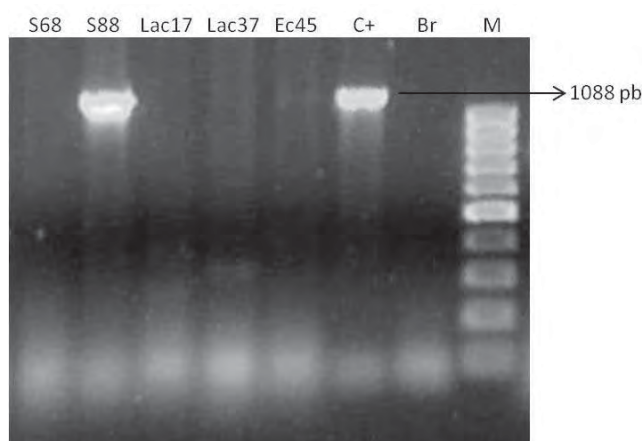


Figura 5 – Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene *bla*_{TEM}. [M: marcador de peso molecular de 100 pb. C+: controle positivo da reação. Br: controle negativo da reação.]

Os perfis de suscetibilidade dos quatro isolados nos quais *bla*_{TEM} foi detectado sugerem a expressão de ESBL (Tabela 9), pois apresentam resistência a cefalosporinas de terceira geração, como a cefotaxima e a ceftriaxona. De acordo com o CLSI (2011), cepas que apresentam resistência às cefalosporinas de terceira geração são consideradas como produtoras de ESBL. Porém, a enzima TEM-1, codificada pelo gene *bla*_{TEM-1} identificado em S88, S105, S137 e Lac55, não é uma ESBL. Assim, outra enzima deve ser a responsável por estes perfis de resistência. Em S105 e S137 foi detectado um gene *bla*_{CTX-M} (ver seção 4.2.1.4), o que explica o perfil de resistência destes isolados, porém em S88 e Lac55 não foi detectado nenhum outro gene, sugerindo a existência de outros genes codificadores de ESBL que ainda não foram testados.

Tabela 9 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene *bla*_{TEM}.

Isolado		S88	S105	S137	Lac55
Espécie		<i>C. youngae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
Antimicrobianos	AMC (13/18)	6	14	16	14
	SAM (11/15)	6	6	10	12
	TZP (17/21)	18	20	26	23
	KF (14/18)	6	6	6	6
	FEP (14/18)	26	13	18	18
	CTX (22/26)	6	10	15	16
	EFT (19/23)	9	9	14	NT
	CRO (19/23)	8	9	14	14
	FOX (14/18)	6	25	29	25
	CAZ (17/21)	8	20	26	24
	ATM (17/21)	14	17	21	22
	ETP (19/23)	24	22	32	29
	IPM (19/23)	24	26	32	26
	CN (12/15)	22	10	22	20
	TOB (12/15)	23	NT	NT	NT
	AK (14/17)	23	20	22	20
	LEV (13/17)	26	20	30	22
	ENO (15/21)	23	16	30	16
	OFX (12/16)	24	18	NT	18
	MXF (16/20)	23	16	NT	16
	NA (13/19)	22	16	22	10

NT: antimicrobiano não testado. Números marcados em vermelho: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano testado. Números marcados em preto: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano testado. Números marcados em verde: tamanho do halo que indica resistência intermediária ao antimicrobiano testado.

4.2.1.4 Detecção e caracterização de *bla*_{CTX-M}

As figuras 3 e 6 mostram a amplificação do fragmento de 544 pb, comum em todos os *bla*_{CTX-M} descritos até o momento, nas cepas S11 (*Proteus mirabilis*), S105 (*K. pneumoniae*), S137 (*E. coli*), Ec32 (*C. diversus*) e Lac 60 (*E. coli*), todas provenientes de CRF. A Tabela 10 apresenta o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos destas cinco cepas. A cepa Lac3 (*K. pneumoniae*) apresentou uma banda de mesmo peso molecular, porém muito fraca no gel de agarose (Figura 6). Assim, foi também submetida ao teste de RFLP, juntamente com as outras cinco cepas, para confirmar a presença de *bla*_{CTX-M} em Lac3, apesar de esta não apresentar perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos sugestivo da presença deste gene (Tabela 6).

O perfil de suscetibilidade apresentado pelas cinco cepas onde *bla*_{CTX-M} foi detectado também sugere a produção de ESBL, pois todos possuem resistência, ou mesmo resistência intermediária, a cefalosporinas de terceira geração (Tabela 10). Os isolados S11, S105 e Lac60 apresentam, inclusive, resistência ao cefepime, uma cefalosporina de quarta geração; e Ec32 apresenta resistência intermediária à cefotaxima e ao ceftiofur, porém a resistência

intermediária é considerada como resistência, quando na prática clínica e na pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos (CLSI, 2011).

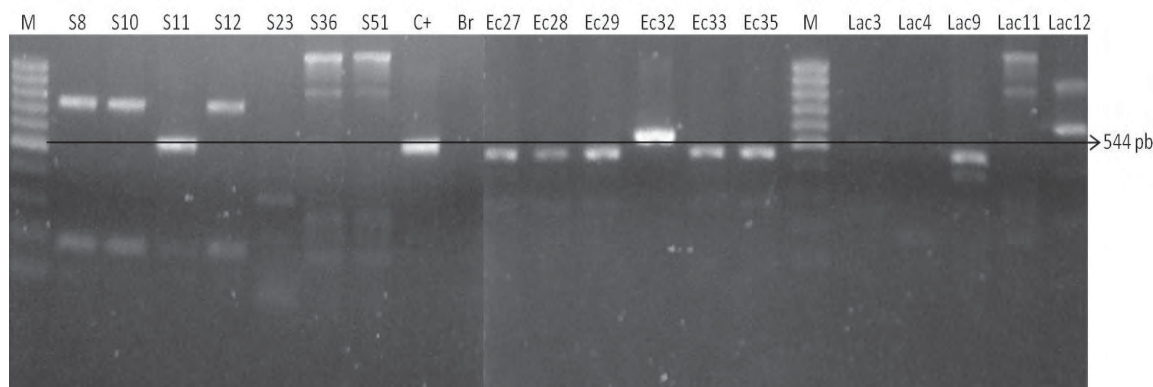


Figura 6 – Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene *bla*_{CTX-M}. [M: marcador de peso molecular de 100 pb. C+: controle positivo da reação. Br: controle negativo da reação.]

A presença do gene *bla*_{CTX-M-2-like} foi confirmada em cinco isolados (S11, S105, S137, Ec32 e Lac 60), como mostra a Figura 7. As demais cepas submetidas à RFLP, inclusive a cepa Lac3, não apresentaram nenhum perfil de restrição conhecido para os grupos de *bla*_{CTX-M}. O sequenciamento identificou os cinco genes detectados como *bla*_{CTX-M-2}.

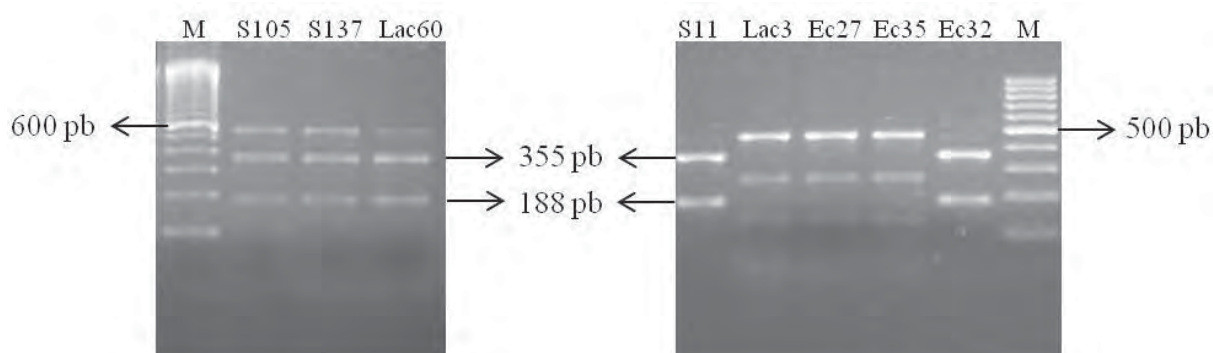


Figura 7 – Gel de eletroforese da RFLP para detecção do grupo do gene *bla*_{CTX-M} nas cepas indicadas. [M: marcador de peso molecular de 100 pb.]

Assim como para os demais genes discutidos até o momento, existem poucos relatos na literatura sobre a detecção de *bla*_{CTX-M} em bactérias isoladas de carnes, havendo casos no Japão (SHIRAKI et al., 2004), em *E. coli* isoladas de carcaças de gado; na França e Bélgica, em *Salmonella* isoladas de aves (BERTRAND et al., 2006; CLOECKAERT et al., 2010), e em *E. coli* e *Salmonella* isoladas de aves na Bélgica, França, Espanha e Guiana Francesa (FERNÁNDEZ et al., 2007).

Tabela 10 – Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene *bla*_{CTX-M}.

Isolado		S11	S105	S137	Ec32	Lac60
Espécie		<i>P. mirabilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. diversus</i>	<i>E. coli</i>
Antimicrobianos	AMC (13/18)	13	14	16	13	18
	SAM (11/15)	13	6	10	19	10
	TZP (17/21)	25	20	26	25	28
	KF (14/18)	6	6	6	12	6
	FEP (14/18)	11	13	18	26	15
	CTX (22/26)	11	10	15	24	10
	EFT (19/23)	18	9	14	22	NT
	CRO (19/23)	12	9	14	14	10
	FOX (14/18)	21	25	29	7	28
	CAZ (17/21)	24	20	26	26	24
	ATM (17/21)	26	17	21	24	16
	ETP (19/23)	16	22	32	12	30
	IPM (19/23)	20	26	32	24	30
	CN (12/15)	15	10	22	18	22
	TOB (12/15)	18	NT	NT	19	NT
	AK (14/17)	18	20	22	20	22
	LEV (13/17)	19	20	30	30	20
	ENO (15/21)	12	16	30	28	14
	OFX (12/16)	14	18	NT	26	17
	MXF (16/20)	10	16	NT	24	17
	NA (13/19)	6	16	22	24	6

NT: antimicrobiano não testado. Números marcados em vermelho: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano testado. Números marcados em preto: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano testado. Números marcados em verde: tamanho do halo que indica resistência intermediária ao antimicrobiano testado.

O gene *bla*_{CTX-M-2} dissemina-se facilmente (BAUERNFEIND et al., 1992; RADICE et al., 2002) e, de fato, tem sido encontrado em diferentes hospitais no Brasil (DO CARMO FILHO et al., 2008; MINARINI et al., 2008; TOLLENTINO et al., 2011). Além disso, um estudo importante, realizado no Reino Unido, revelou que 40% das cepas de *E. coli* produtoras de ESBL, isoladas a partir de peitos de frango importados do Brasil, eram produtoras de CTX-M-2 (WARREN et al., 2008). No presente estudo, 100% dos genes codificadores de CTX-M identificados são *bla*_{CTX-M-2}, fato importante de se destacar já que as cepas foram isoladas a partir de carnes destinadas ao consumo humano. Este resultado demonstra, novamente, a ampla disseminação de *bla*_{CTX-M-2} entre as Enterobacteriaceae e reforça a importância de programas de vigilância na cadeia produtiva de carnes no país, já que o Brasil é referência mundial no comércio de carnes, inclusive grande exportador de carnes de frango para a União Européia (BRASIL, 2012). A contaminação de carne produzida no Brasil com essas cepas é preocupante, pois, além de constituir um importante problema de saúde pública, pode, futuramente, afetar as relações comerciais do país.

4.2.2 Testes para detecção e caracterização dos integrons

A Figura 8 mostra a imagem do gel de eletroforese realizada com os “amplicons” obtidos após a reação de PCR para detecção de integrons de classe 1, que visou identificar a presença de cassetes gênicos inseridos entre o gene da integrase do integron de classe 1 (*intI1*) e o gene *qacEA*. O *primer* “forward” usado nesta reação anela-se a uma distância aproximada de 70 pb após *intI1*, e o *primer* “reverse”, no início de *qacEA*. Para a maioria dos isolados testados observou-se várias bandas, sendo que em alguns foram observadas até cinco ou seis bandas nítidas. Este resultado sugeriu duas hipóteses: i) as várias bandas correspondem à ligação inespecífica entre os *primers* e o DNA teste; ou ii) as várias bandas representam, de fato, diferentes integrons de classe 1 nas cepas. Esta segunda hipótese será investigada através do sequenciamento gênico, que confirmará se as várias bandas observadas para cada cepa no gel da eletroforese representam, de fato, diferentes combinações de cassetes gênicos. Sevillano e colaboradores (2006), utilizando o mesmo par de *primers* para detectar integrons de classe 1, obtiveram “amplicons” de tamanhos variados, compreendendo de 600 a 1700 pb, inclusive com mais de um “amplicon” em algumas cepas. Além disso, a co-existência de diferentes integrons de classe 1, com tamanhos moleculares diferentes devido ao carregamento de diferentes genes, em uma mesma cepa bacteriana, também foi previamente descrita por Kadlec e Schwarz (2008).

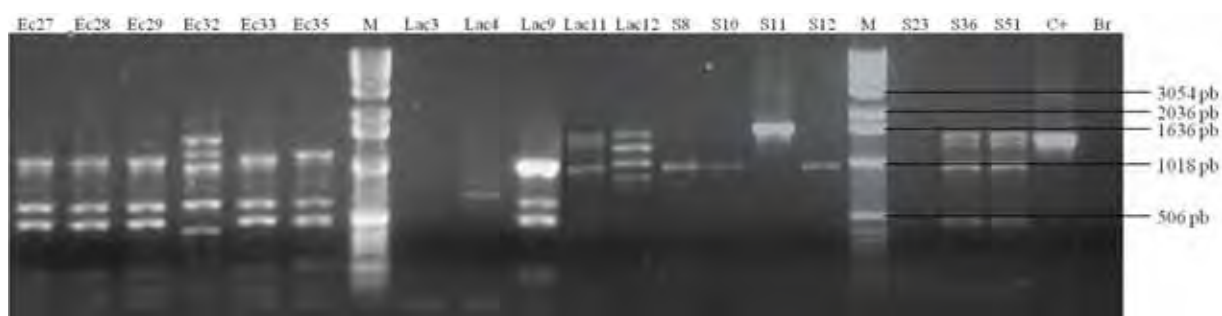


Figura 8 – Gel de eletroforese da PCR para detecção do integron de classe 1. [M: marcador de peso molecular de 1 kb. C+: controle positivo da reação. Br: controle negativo da reação.]

Considerando a proposta inicial do projeto, as cepas que apresentaram o gene *bla*_{CTX-M} foram submetidas à pesquisa para a caracterização do ambiente genético destes genes. Inicialmente, realizou-se a PCR com *primers* específicos para a detecção dos genes das integrases dos integrons de classe 1, classe 2 e classe 3 (*intI1*, *intI2* e *intI3*, respectivamente). O gene *intI1* foi detectado em quatro das cinco cepas carreadoras de *bla*_{CTX-M-2} (S11, S105,

S137 e Lac60) e *intI2* foi detectado apenas na cepa S11, mostrando que esta carrega, ao menos, um integron de classe 1 e um de classe 2 (Figura 9).

Em nenhuma das cinco cepas foi detectado *intI3*, embora bandas inespecíficas possam ser observadas no gel da eletroforese (Figura 9).

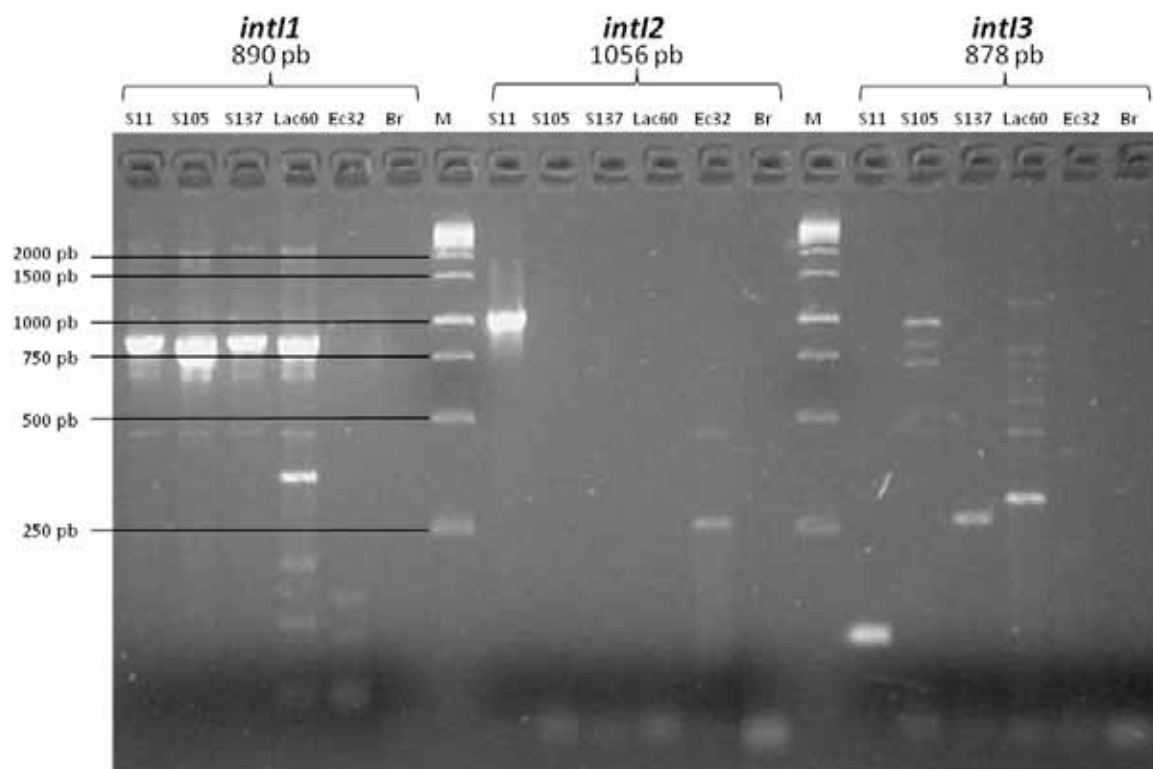


Figura 9 – Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene das integrases dos integrons de classe 1, 2 e 3. [M: marcador de peso molecular de 1 kb. C+: controle positivo da reação para integron de classe 1. Br: controle negativo de cada reação. Na parte superior da figura, abaixo no nome de cada gene, está o tamanho da banda, em pb, correspondente a cada gene.]

As cepas que apresentaram *intI1* foram submetidas à PCR com par de *primers* específico para a detecção de integrons de classe 1, pois amplifica a região onde estão localizados os cassetes gênicos nesse tipo de integron, sendo este o elemento genético móvel onde os genes *bla*_{CTX-M} são mais comumente descritos. A Figura 10 mostra os “amplicons” obtidos após a PCR.

No caso da cepa S11, além de *bla*_{CTX-M-2}, é possível que haja, ao menos, mais um gene inserido no integron, já que o primeiro possui por volta de 800 pb, restando uma região de 800 pb para outros genes. Esta segunda região poderia compreender um gene que confere resistência às quinolonas, por exemplo um *qnr* (com pouco mais de 600 pb; ver GenBank: JQ924197.1), já que nessa cepa de *P. mirabilis* observou-se resistência ao ácido nalidíxico, enrofloxacin e moxifloxacin, além de resistência intermediária à ofloxacin (Tabela 10).

Ainda, é possível observar uma banda, bastante fraca no gel de eletroforese, de tamanho aproximado de 3500 pb, que pode representar uma segunda estrutura de integron de classe 1 inserido nessa cepa (Figura 10). A banda se apresentar fraca no gel pode ser devido ao fato de que, por ser o “amplicon” muito maior que o representado pela banda forte, de 1600 pb, este último tenha sido amplificado mais vezes, em detrimento do de 1600 pb, gerando a diferença de visualização.

A cepa S105 apresentou, claramente, duas bandas distintas no gel de eletroforese, uma com aproximadamente 1000 pb e a outra, 1250 pb (Figura 10), sugerindo a presença de duas estruturas diferentes de integron de classe 1 na cepa. Esta possibilidade é reforçada pela observação da banda fortemente marcada na Figura 9, que representa o gene da integrase. É possível que a banda represente a presença de dois genes *intI1*. Da mesma forma como ocorreu para a cepa S11, em S105 foram também observadas bandas fracas de maior tamanho molecular (2000, 2500 e 3000 pb, aproximadamente). Elas também podem representar diferentes composições de integrons dentro da cepa. Este fato é sugerido pelo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, em que se observa resistência aos aminoglicosídeos e às quinolonas (Tabela 10), e pela presença de outros genes nessa cepa de *K. pneumoniae*. Mais uma vez, o sequenciamento gênico mostra-se indispensável para a confirmação desta hipótese.

É plausível que, no caso da cepa S137, *bla*_{CTX-M-2} seja o único cassete gênico inserido no integron, já que esta apresentou, nitidamente, uma banda de peso molecular por volta de 800 pb no gel de eletroforese (Figura 10). Essa cepa de *Escherichia coli* apresenta resistência a cefalosporinas de terceira geração, provavelmente gerada pela expressão de CTX-M-2, e a nenhuma outra classe de antimicrobianos testada (Tabela 10). O gene *bla*_{TEM-1} identificado nesta cepa pode estar presente em outro local do genoma da bactéria, por exemplo, em um plasmídeo conjugativo R, como já demonstrado na literatura (SEOL et al., 2006).

Assim como S105, a cepa Lac60 apresentou um “amplicon” nítido de 1000 pb (Figura 10), o que pode representar o gene *bla*_{CTX-M-2} inserido no integron, além de regiões adjacentes a este, como alguma orf ou mesmo outro gene de pequeno tamanho, embora não tenha sido detectado nenhum outro além de *bla*_{CTX-M-2}. Apesar disso, o perfil de suscetibilidade apresentado por esta cepa de *E. coli* mostra a resistência a algumas das quinolonas testadas (Tabela 10). É possível que genes de resistência às quinolonas de localização plasmidial possam estar inseridos em outra estrutura de integron de classe 1 na mesma cepa. Isso se deve ao fato de Lac60 ter apresentado uma banda fraca, de aproximadamente 2000 pb, no gel de eletroforese (Figura 10).

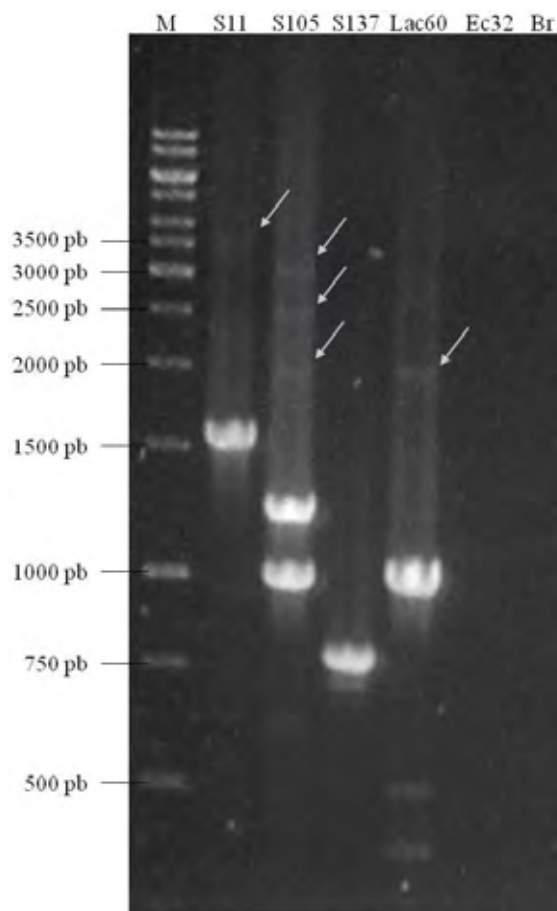


Figura 10 – Gel de eletroforese da PCR para amplificação da região codificadora de cassetes gênicos do integron de classe 1 nas cepas que possuem o gene *bla*_{CTX-M-2}. [M: marcador de peso molecular de 1 kb. C+: controle positivo da reação para integron de classe 1. Br: controle negativo da reação. As setas azul-claro indicam a posição das bandas fracamente coradas]

Cada uma das quatro cepas onde foi detectado o gene *int1* foram submetidas a PCR utilizando-se as cinco combinações de *primers* descritas na Tabela 3 para a investigação da presença de diferentes regiões da estrutura de um integron de classe 1.

A cepa Ec32, que parece não apresentar um integron de classe 1 (pois *int1* não foi amplificado nela) também foi submetida à PCR com as cinco diferentes combinações de *primers* para confirmar a inexistência do mesmo nesta cepa de *C. diversus*. Esse resultado sugere que o gene *bla*_{CTX-M-2} de Ec32 pode estar localizado em outra região do genoma, como, por exemplo, inserido no cromossomo bacteriano. Este fato é relatado na literatura (FABRE et al., 2009; HARADA et al., 2012), e a caracterização do ambiente genético do *bla*_{CTX-M-2} identificado neste *C. diversus* irá elucidar a questão.

A Figura 11 ilustra a estrutura concebida para o integron de classe 1 nas amostras estudadas. Com base nesta estrutura foram montadas as combinações de pares de *primers* indicadas na Tabela 4, na tentativa de elucidar o ambiente genético dos genes *bla*_{CTX-M-2} detectados.

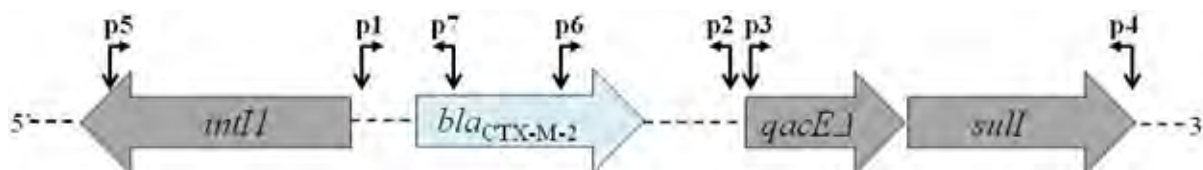


Figura 11 – Esquema da estrutura concebida para o integron de classe 1 na definição dos pares de *primers* utilizados para caracterizar o ambiente genético dos genes *bla*_{CTX-M-2} possivelmente inseridos nesse tipo de estrutura. [As setas grandes em cinza representam os genes obrigatoriamente presentes para que a estrutura seja um integron de classe 1; a seta grande azul clara representa o gene supostamente inserido no integron. **p1** a **p7** indicam os *primers* utilizados; **p1** e **p2**, descritos na Tabela 1, e **p3** a **p7**, descritos na Tabela 4: **p1** = *primer* “forward” (F) da região dos cassetes gênicos do integron de classe 1; **p2** = *primer* “reverse” (R) da região dos cassetes gênicos do integron de classe 1; **p3** = *primer* F do gene *qacEΔ*; **p4** = *primer* R do gene *sull*; **p5** = *primer* R do gene *intI1*; **p6** = *primer* F do final de *bla*_{CTX-M-2}; **p7** = *primer* R do início de *bla*_{CTX-M-2}. A seta ↓ indica o local de anelamento do *primer*. As setas → e ← indicam a direção da amplificação.]

Com o primeiro par de *primers* (“Par 1”) amplificou-se uma região com aproximadamente 1200 pb (Figura 12), o que condiz com o esperado, já que o gene *qacEΔ* possui mais de 300 pb e o gene *sull*, mais de 800 pb (acesso no GenBank: JN596279.1). Esses “amplicons” devem ser sequenciados para a confirmação da identidade. A cepa Ec32, onde não havia sido detectado o gene *intI1*, não apresentou a banda correspondente aos genes investigados, corroborando a inexistência da estrutura no seu genoma, já que tal elemento genético tem como constituição básica, os genes *qacEΔ* e *sull*.

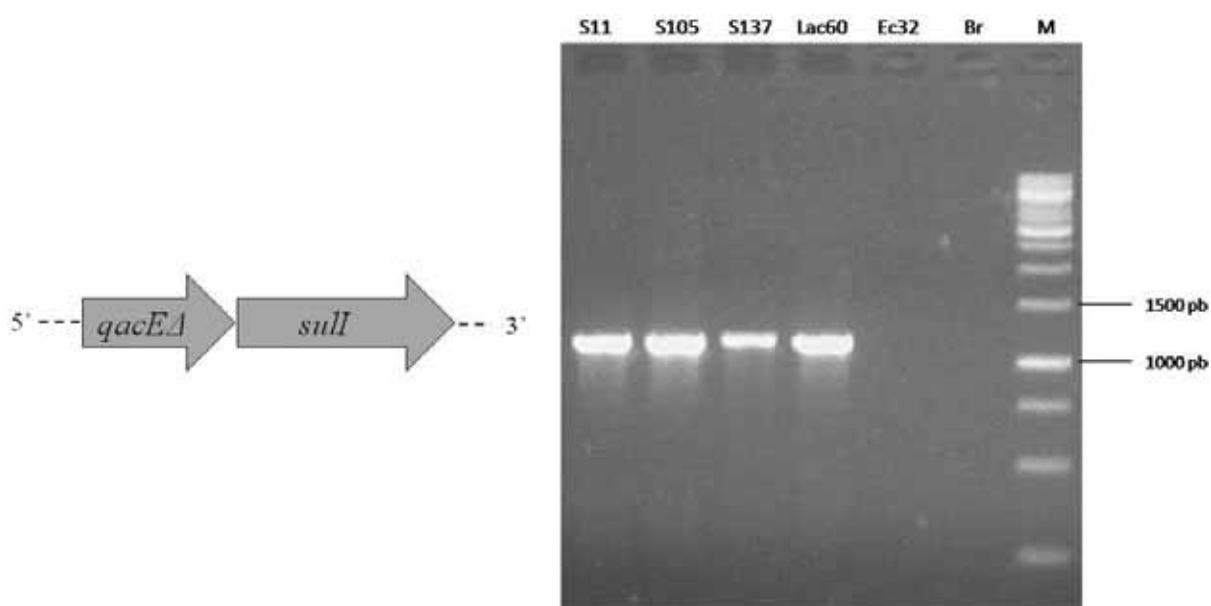


Figura 12 – Gel de eletroforese da PCR para caracterização do integron de classe 1 nas cepas que apresentaram *bla*_{CTX-M-2} com o “Par 1” de *primers* da Tabela 3. [M: marcador de peso molecular de 1 kb. Br: controle negativo da reação. O esquema, à esquerda, representa a porção do integron concebido amplificada na reação.]

Na PCR com o segundo par de *primers* (“Par 2”) era esperado que as bandas representassem uma amplificação total do integron de classe 1 para cada cepa, pois o *primer* “forward” utilizado tem como alvo o final do gene da integrase *int1* (amplificando quase 900 pb desse gene – Figuras 9 e 11) e o *primer* “reverse”, o final do gene *sulI*, comumente localizado no final do integron. Essa PCR difere da primeira reação, a de detecção do integron de classe 1 (Figura 10), por amplificar, também, o gene da integrase dos integrons e os genes *qacEA* e *sulI*. Assim, espera-se um acréscimo aproximado de 2100 pb nos “amplicons” dessa reação comparados com o tamanho dos “amplicons” da PCR com os *primers* para a detecção dos cassetes gênicos.

Com relação à cepa S11, foi observada uma banda de aproximadamente 3700 pb no gel de eletroforese (Figura 13), 2100 pb a mais do que o “amplicon” apresentado por essa cepa no gel da PCR para detecção dos cassetes gênicos (Figura 10). Assim, pode-se dizer que o acréscimo esperado no tamanho da banda foi observado.

A cepa S105 apresentou uma banda pouco maior que 3000 pb no gel de eletroforese da PCR com o Par 2 (Figura 13). Não é possível visualizar corretamente o tamanho molecular desse “amplicon” porque a banda correspondente está corada muito fortemente no gel, talvez indicando, novamente, muita amplificação da região pelo fato de haver duas estruturas de integron de classe 1 no genoma dessa cepa. Na PCR de detecção dos cassetes gênicos (Figura 10) foram observadas duas bandas (1000 e 1250 pb) que, acrescidas dos 2100 pb da PCR com os *primers* do Par 2, resultam no tamanho da banda encontrada nessa reação para essa cepa.

Já a cepa S137 apresentou uma banda com pouco menos de 3000 pb no gel de eletroforese da PCR com o “Par 2” de *primers* (Figura 13). Essa banda também pode representar a amplificação correta da região, já que na PCR de detecção dos cassetes gênicos (Figura 10) foi gerado um “amplicon” de 800 pb; acrescentando a este os 2100 pb esperados, o resultado seria uma banda de 2900 pb.

A cepa Lac60 apresentou uma banda pouco maior que 3000 pb no gel da eletroforese da PCR com o Par 2 (Figura 13). Comparando este resultado com o da Figura 10, onde é observada uma banda nítida, de 1000 pb, supõe-se que a banda gerada na PCR com o Par 2 represente a amplificação adicional dos gene *intI1*, *qacEA* e *sulI* nessa cepa de *E. coli*, o mesmo sugerido para a *K. pneumoniae* S105.

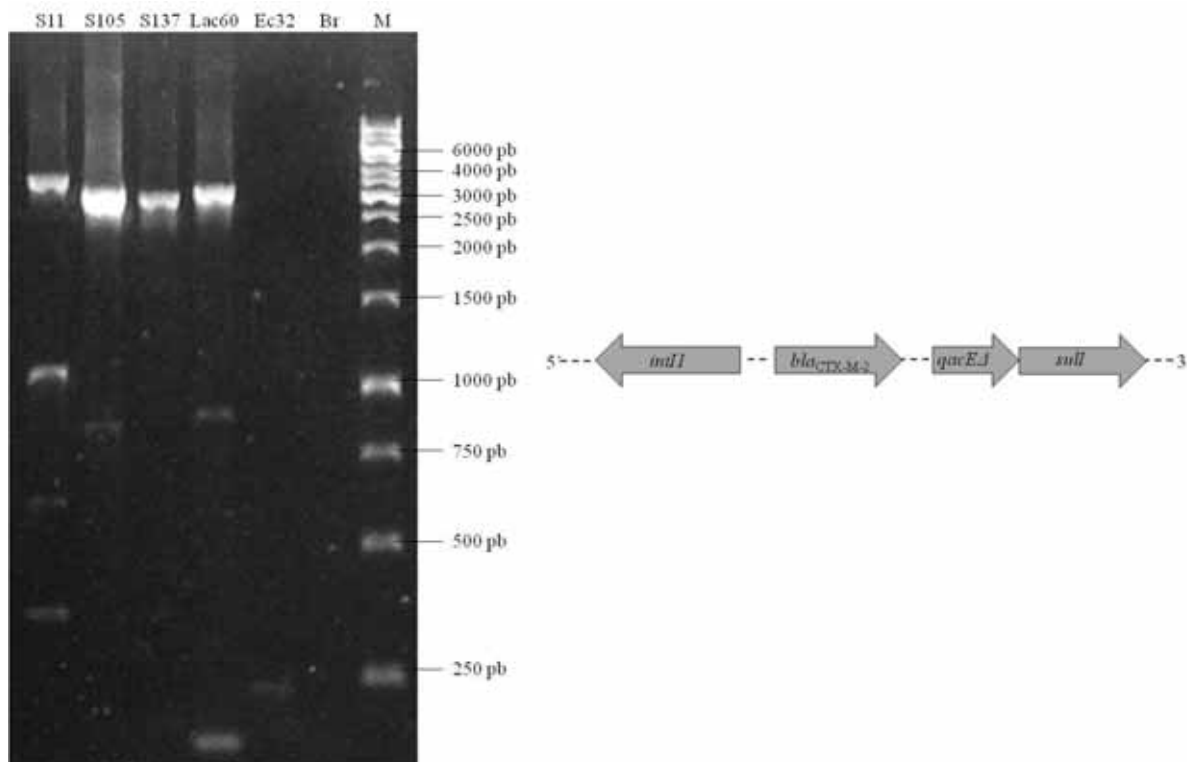


Figura 13 – Gel de eletroforese da PCR para caracterização do integron de classe 1 nas cepas que apresentaram *bla_{CTX-M-2}* com o “Par 2” de *primers* da Tabela 3. [M: marcador de peso molecular de 1 kb. Br: controle negativo da reação. O esquema, à direita, representa a porção do integron concebido amplificada na reação.]

O terceiro par de *primers* (“Par 3”) visou a amplificação de uma região menor que a amplificada com o Par 2, constituída pelos genes *qacEA* e *sulI* e o final de *bla_{CTX-M}*. Foi possível amplificar uma região de aproximadamente 2700 pb nas cepas S11, S105, S137 e Lac60 (Figura 14), possivelmente com a mesma constituição nucleotídica nas quatro cepas. Como esperado, nenhum fragmento foi amplificado na cepa Ec32. Como o *primer* “forward” do “Par 3” se anela a partir do nucleotídeo localizado na posição 510 do gene *bla_{CTX-M-2}*, e amplifica aproximadamente, mais 300 pb do gene, e o *primer* “reverse” se anela no final do gene *sulI*, e amplifica juntamente com o gene *qacEA* (ambos “downstream” ao *bla_{CTX-M-2}* no integron), mais 1200 pb (Figura 12), a banda de 2700 pb pode representar uma região de aproximadamente 1200 pb existente entre o gene *bla_{CTX-M-2}* e o gene *qacEA*. Entretanto, esta hipótese não condiz com o indício da inexistência de outro cassette gênico inserido entre *bla_{CTX-M-2}* e *qacEA* indicado na PCR com o “Par 2” de *primers* (Figura 13), sendo imprescindível o sequenciamento dos diferentes “amplicons” para caracterizar de forma correta o ambiente genético dos *bla_{CTX-M}* detectados.

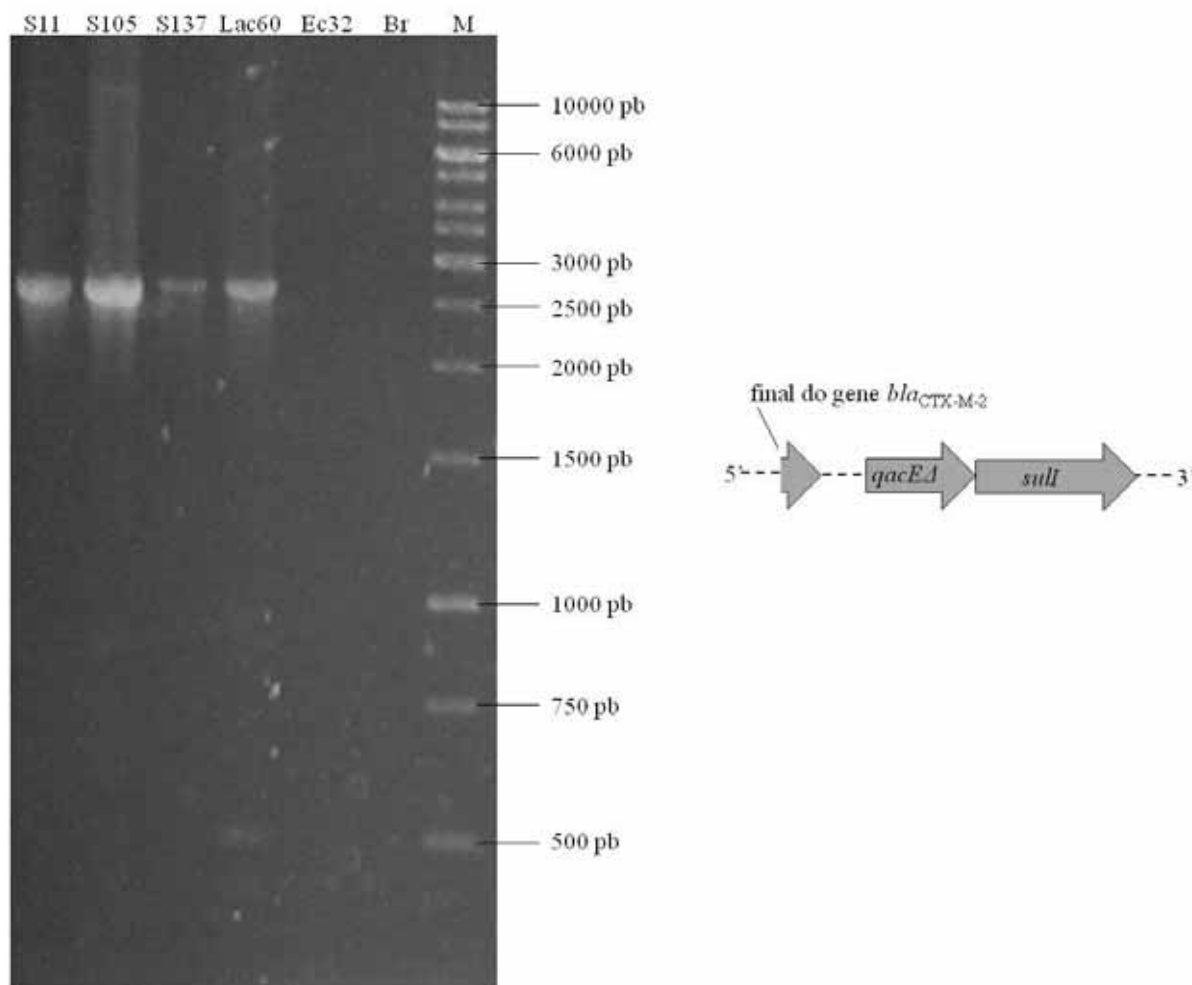


Figura 14 – Gel de eletroforese da PCR para caracterização do integron de classe 1 nas cepas que apresentaram *bla*_{CTX-M-2} com o “Par 3” de *primers* da Tabela 3. [M: marcador de peso molecular de 1 kb. Br: controle negativo da reação. O esquema, à direita, representa a porção do integron concebido amplificada na reação.]

Na Figura 15, que mostra o gel de eletroforese da PCR realizada com o “Par 4” de *primers*, foram observadas bandas de diferentes tamanhos, assim como o padrão das bandas da eletroforese apresentada na Figura 10, porém com bandas de tamanhos maiores. Isso se deve ao fato de que, na reação de detecção dos cassetes gênicos, os produtos amplificados terminam no início do gene *qacEA*, enquanto que nesta reação os produtos são amplificados até o final do gene *sulI* (“downtream” a *qacEA*). Essa nova amplificação gera um produto com mais 1200 pb, exatamente o tamanho acrescido observado no gel de eletroforese da Figura 15.

A Tabela 11 mostra a diferença do tamanho das bandas das eletroforeses apresentadas nas Figuras 10 e 15. Comparando-as, pode-se observar que para cada cepa há um acréscimo aproximado de 1200 pb nos tamanhos das bandas quando a PCR foi realizada com os *primers* do “Par 4”, em relação a PCR de detecção de integron, que amplificou somente a região dos cassetes gênicos do integron de classe 1.

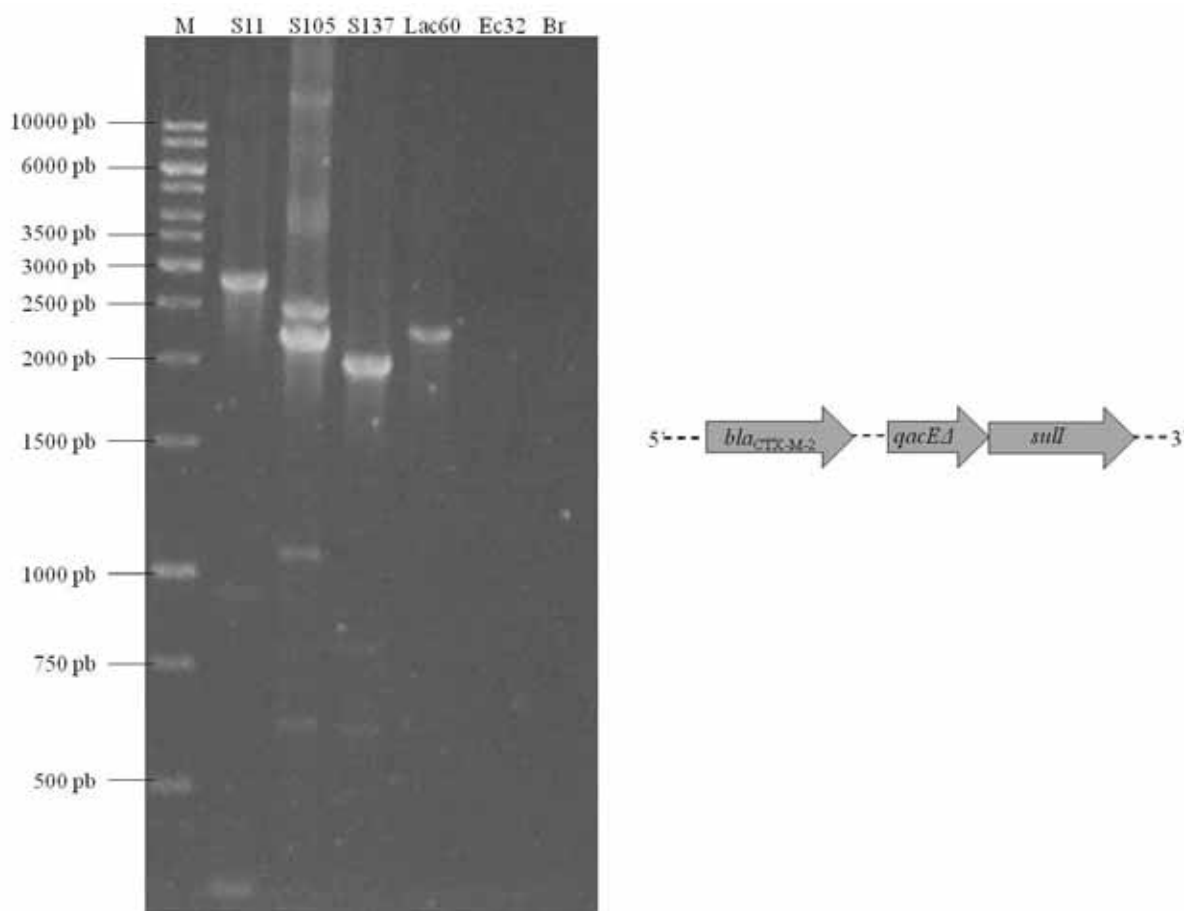


Tabela 11 – Comparação entre os tamanhos das bandas das eletroforeses com os dois pares de *primers*, mostradas nas Figuras 10 e 15, nas cepas que apresentam integron.

	Tamanho aproximado das bandas (em pb)			
	S11	S105	S137	Lac60
Figura 10	1600	1250 1000	800	1000
Figura 15	2800	2500 2200	2000	2200

A PCR com os *primers* do “Par 5” amplificou regiões de tamanhos diferentes entre as cepas carreadoras de *bla*_{CTX-M-2} (Figura 16). O *primer* “forward” se anela no final do gene *intI1*, enquanto que o *primer* “reverse” se anela no início de *bla*_{CTX-M-2} (nos nucleotídeos 210 a 227), visando a amplificação da região entre esses genes, além de *intI1* total.

Em S11 observa-se uma banda de, aproximadamente, 1600 pb no gel da eletroforese (Figura 16). Como são amplificados em torno de 900 pb do gene *intI1* e os 200 pb iniciais do

gene *bla*_{CTX-M-2}, a banda pode representar uma região de 500 pb entre os dois genes, onde pode haver uma orf, ou mesmo, outro gene inserido.

Na cepa S105 são observadas duas bandas: uma com aproximadamente 1100 pb, e outra com 1350 pb (Figura 16). As duas podem ser uma representação da presença de duas estruturas diferentes de integron de classe 1 no genoma dessa bactéria, sendo que em um deles o gene *bla*_{CTX-M-2} estaria localizado logo após o gene da integrase, enquanto que no outro integron poderia haver uma pequena região de 200 pb entre eles. Porém, a amplificação de duas bandas na PCR para essa cepa sugere que a mesma apresenta *bla*_{CTX-M-2} duplicado, estando uma cópia em cada integron.

Em Lac60, que apresentou uma banda de aproximadamente 1100 pb (Figura 16), a explicação pode ser a mesma dada para a banda de mesmo peso molecular da cepa S105, ou seja, *bla*_{CTX-M-2} corresponde ao cassete gênico inserido logo após *intI1*.

Já para a cepa S137 foi detectada uma banda com tamanho molecular aproximado de 800 pb (Figura 16). Considerando o explicado anteriormente para essa PCR, cujos “amplicons” devem conter, no mínimo, 1100 pb, acreditamos que esta reação se mostrou ineficaz. Assim, os resultados obtidos para as outras três cepas também devem ser reavaliados.

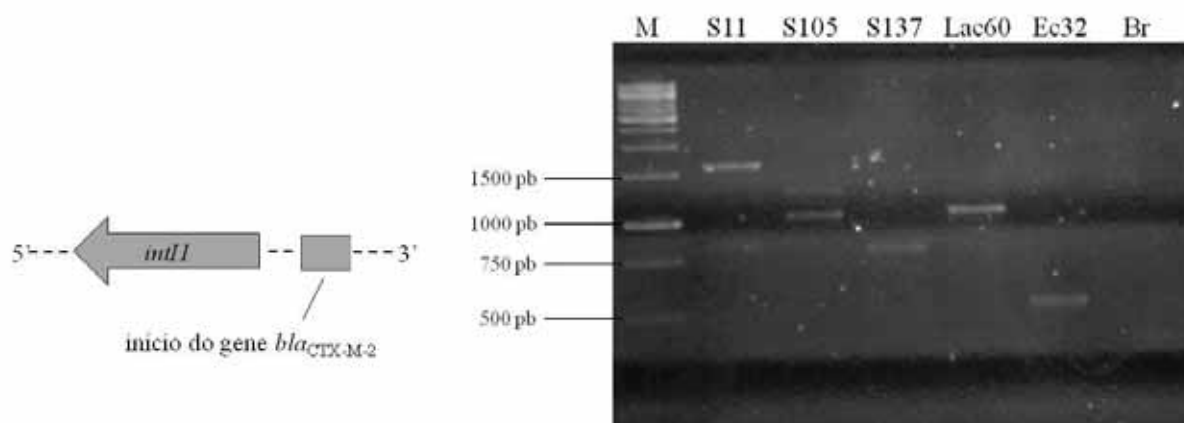


Figura 16 – Gel de eletroforese da PCR para caracterização do integron de classe 1 nas cepas que apresentaram *bla*_{CTX-M-2} com o “Par 5” de *primers* da Tabela 3. [M: marcador de peso molecular de 1 kb. Br: controle negativo da reação. O esquema, à esquerda, representa a porção do integron concebido amplificada na reação.]

4.2.3 Tipagem molecular

A técnica de ERIC-PCR foi utilizada para a tipagem molecular. Entretanto, apesar de ser descrita como um método rápido e com boa capacidade discriminatória para a tipagem molecular (LI et al., 2009), neste estudo muitos isolados não puderam ser tipados por esta técnica, provavelmente devido à degradação de DNA.

A Figura 17 mostra o dendrograma das cepas de *Salmonella* spp. isoladas. Os resultados indicam que as cepas S4 e S6 apresentam o mesmo perfil genético e, juntamente com S1, formam um *cluster*. A cepa S5 é a que apresenta maior similaridade com este *cluster* (82,2%), fato corroborado pela semelhança no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos (Figura 17 e Tabela 6). As cepas S2, S3 e S7 são bastante diferentes entre si e entre as demais. Como S1 a S7 foram as únicas cepas identificadas como *Salmonella* spp., e S1, S4 e S6 formam um *cluster* a parte, pode-se dizer que foram isoladas cinco diferentes cepas do taxon em uma mesma amostra de carne.

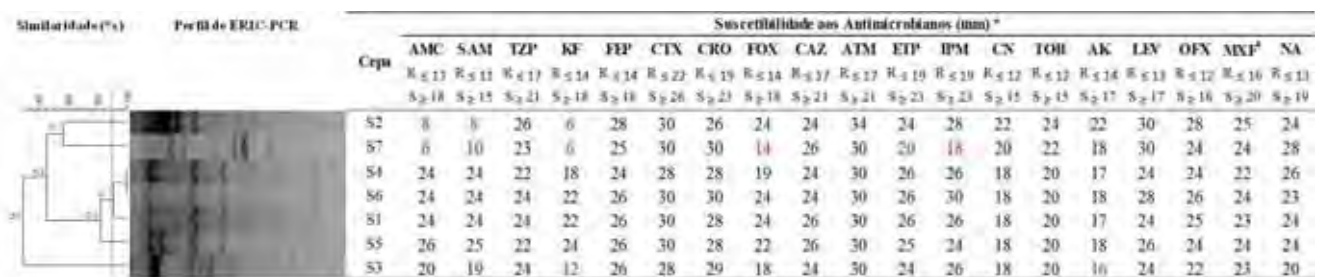


Figura 17 – Dendrograma das sete cepas de *Salmonella* isoladas a partir de CRS. [A linha azul traça o limite de similaridade (90%) considerada para a formação de *clusters* no dendrograma.]

* De acordo com CLSI (2008; 2011).

^a Determinação do halo de suscetibilidade de acordo com EUCAST (2011).

R: tamanho do halo que indica resistência ao antibiótico (números marcados em vermelho); S: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antibiótico (números marcados em preto); valores intermediários a R e S indicam resistência intermediária ao antibiótico (números marcados em verde).

Dentre os demais isolados tipados por ERIC-PCR, observa-se que existem isolados diferentes com mesmo perfil, ou perfis similares de ERIC-PCR, mostrando a existência de clones na coleção de bactérias do estudo (Figuras 18-20). A Figura 18 mostra o perfil de ERIC-PCR dos isolados recuperados a partir de carne bovina (CRB), sendo observados dois clones e diversas cepas com perfil genético distinto, indicando a contaminação destas amostras por diversas cepas bacterianas.

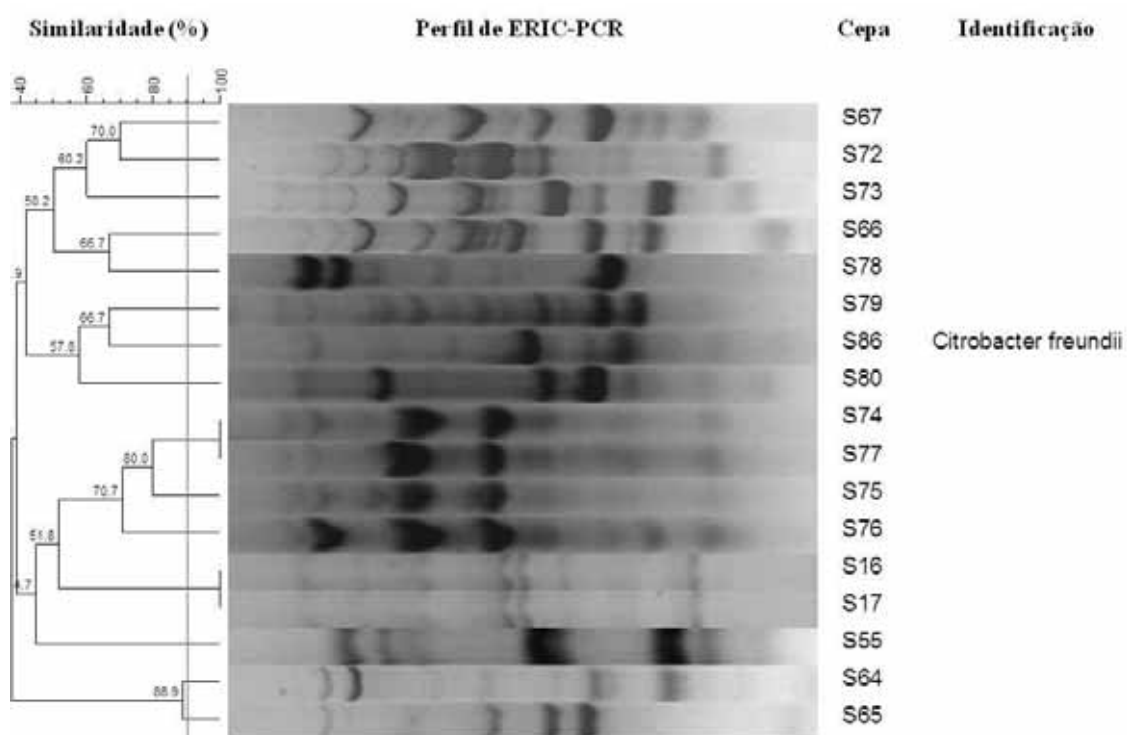


Figura 18 – Dendrograma dos isolados recuperados a partir de CRB, com os quais foi possível realizar a tipagem molecular. [A linha azul traça o limite de similaridade (90%) considerada para a formação de *clusters* no dendrograma.]

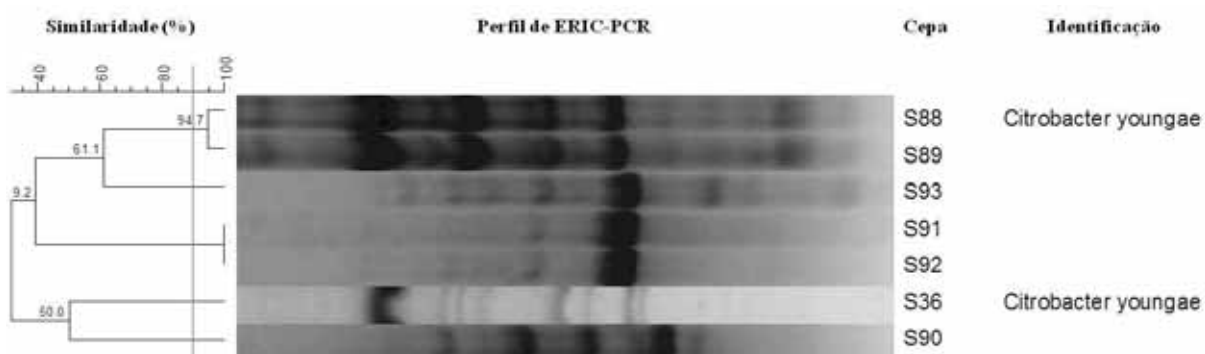


Figura 19 – Dendrograma dos isolados recuperados a partir de CRS, com os quais foi possível realizar a tipagem molecular, não estando apresentadas as cepas identificadas como *Salmonella*. [A linha azul traça o limite de similaridade (90%) considerada para a formação de *clusters* no dendrograma.]

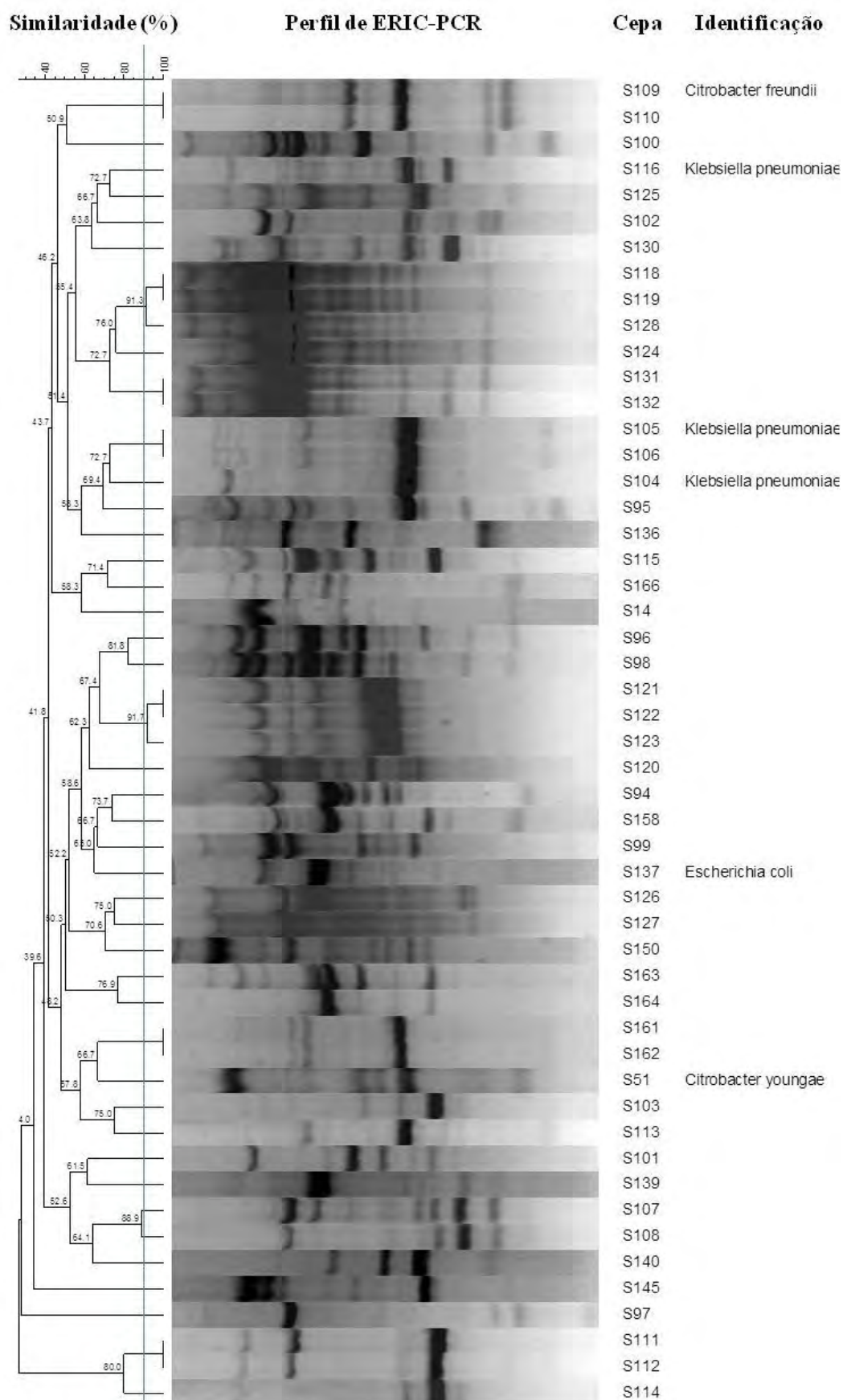


Figura 20 – Dendrograma dos isolados recuperados a partir de CRF, com os quais foi possível realizar a tipagem molecular. [A linha azul traça o limite de similaridade (90%) considerada para a formação de *clusters* no dendrograma.]

A Figura 19 mostra o perfil de ERIC-PCR dos isolados recuperados a partir de carne suína (CRS), sendo observado um clone e diversas cepas com perfil genético distinto, indicando também a contaminação destas amostras por diferentes cepas bacterianas.

A Figura 20 mostra o perfil de ERIC-PCR dos isolados recuperados a partir de carne de frango (CRF), sendo observados sete clones e diversas cepas com perfil genético distinto. Este resultado indica a contaminação das amostras de CRF por uma grande diversidade de cepas bacterianas.

Como o principal objetivo deste estudo foi a identificação de cepas produtoras de ESBLs e a detecção dos genes responsáveis por este mecanismo de resistência, foram identificadas apenas as cepas que apresentaram resistência às drogas β -lactâmicas. Por esta razão, não foi determinada a diversidade de espécies bacterianas isoladas das amostras do estudo. Assim, nas Figuras 18, 19 e 20, muitos isolados não aparecem com sua identificação específica.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

O principal objetivo deste estudo foi identificar a presença de cepas de *Salmonella* spp. e *E. coli* resistentes às cefalosporinas de terceira geração e identificar, nestas bactérias, os genes responsáveis por este mecanismo de resistência. Ao final do estudo, concluiu-se que:

- *Salmonella* foi isolada apenas a partir de carne suína, sendo observada a presença de cinco cepas distintas em uma mesma amostra de carne, e *Escherichia coli* foi isolada apenas a partir de carne de frango.

- Todos os *bla*_{CTX-M-2} foram detectados em cepas isoladas de amostras de carne de frango.

- Entre as cinco cepas que apresentaram o gene *bla*_{CTX-M-2}, em quatro delas o mesmo encontra-se, possivelmente, localizado no interior de um integron de classe 1.

- Genes *bla*_{SHV-like} foram os mais comumente detectados, porém entre as amostras sequenciadas, apenas uma codifica uma β -lactamase de espectro estendido (*bla*_{SHV-2}).

- A presença de bactérias patogênicas carreadoras de genes codificadores de β -lactamases de espectro restrito em carnes destinadas ao consumo humano, como os *bla*_{TEM-1} e o *bla*_{SHV-11} detectados, é preocupante devido ao fato de poderem sofrer mutações que os transformem em genes codificadores de ESBLs.

- Outras espécies de Enterobacteriaceae multirresistentes e carreadoras de genes de ESBLs estão presentes nas carnes, podendo constituir um risco à saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. **Emerging Infectious Disease**, v. 12, n. 7, p. 1180-1181, 2006.

AJIBOYE, R. M.; SOLBERG, O. D.; LEE, B. M.; RAPHAEL, E.; DEBROY, C.; RILEY, L. W. Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 365-371, 2009.

AKTAS, Z.; POIREL, L.; SALCIOGLU, M.; OZCAN, P. E.; MIDILLI, K.; BAL, Ç.; ANG, O.; NORDMANN, P. PER-1- and OXA-10-like β -lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients in Istanbul, Turkey. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 193-198, 2005.

ALEKSHUM, M. N.; LEVY, S. B. The *Escherichia coli* *mar* locus – antibiotic resistance and more. **American Society for Microbiology News**, v. 70, n. 10, p. 451-456, 2004.

ALMEIDA, I. A. Z. C.; PERESI, J. T. M.; CARVALHO, I. S.; RODRIGUES, E. C. A.; MARQUES, D. F.; TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A. *Salmonella*: sorotipos identificados na região de São José do Rio Preto/SP, no período de 1990 – 1999. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 59, n. 1/2, p. 33-37, 2000.

ALMEIDA, R. C. C.; KUAYE, A. Y.; SERRANO, A. M.; ALMEIDA, P. F. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 4, p. 250-254, 1999.

AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.

AMBLER, R. P.; COULSON, A. F. W.; FRÉRE, J. M.; GHUYSEN, J.M.; JORIS, B.; FORSMAN, M.; LEVESQUE, R. C.; TIRABY, G.; WALEY, S. G. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. **Biochemical Journal**, v. 276, p. 269-270, 1991.

ANDREATTI FILHO, R. L. Alimentos funcionais na produção avícola. In: ANDREATTI FILHO, R. L. (Org.). **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Rocca, 2006. cap. 6, p. 41-51.

ANTUNES, P.; MACHADO, J.; SOUSA, J. C.; PEIXE, L. Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella typhimurium* clone expressing an integron-borne OXA-30 β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 429-434, 2004.

ARDUINO, S. M.; ROY, P. H.; JACOBY, G. A.; ORMAN, B. E.; PINEIRO, S. A.; CENTRON, D. *bla*_{CTX-M-2} is located in unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 7, p. 2303-2306, 2002.

ARLET, G.; BARRETT, T. J.; BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; MULVEY, M. R.; WHITE, D. G. *Salmonella* resistance to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1945-1954, 2006.

BARCELLOS, D. E. S. N.; MARQUES, B. M. F. P. P.; MORES, T. J.; COELHO, C. F.; BOROWSKI, S. M. Aspectos práticos sobre o uso de antimicrobianos na suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, suppl. 1, p. S151-S155, 2009.

BARLOW, M.; REIK, R. A.; JACOBS, S. D.; MEDINA, M.; MEYER, M. P.; MCGOWAN JR., J. E.; TENOVER, F. C. High rate of mobilization for *bla*_{CTX-MS}. **Emerging Infectious Disease**, v. 14, n. 3, p. 423-428, 2008.

BARLOW, R. S.; PEMBERTON, J. M.; DESMARCHELIER, P. M.; GOBIUS, K. S. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 838-842, 2004.

BARROW, P. A. Immunity to *Salmonella* and other bacteria. In: DAVISON, T. F.; MORRIS, T. R.; PAYNE, L. N. (Org.). **Poultry Immunology**. (Poultry Science Symposium Series, v.24). Berkshire: Carfax Publishing Company, 1995. p. 243-263.

BAUERNFEIND, A.; CASELLAS, J. M.; GOLDBERG, M.; HOLLEY, M.; JUNGWIRTH, R.; MANGOLD, P.; ROHNISCH, T.; SCHWEIGHART, S.; WILHELM, R. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. **Infection**, v. 20, p. 158-163, 1992.

BAUERNFEIND, A.; JUNGWIRTH, R.; SCHWEIGHART, S.; THEOPOLD, M. Antibakterielle aktivitat und β -laktamase-stabilitat von elf oralcephalosporinen. **Infection**, v. 18, suppl. 3, p. 155-161, 1990.

BAUERNFEIND, A.; STEMLINGER, I.; JUNGWIRTH, R.; MANGOLD, P.; AMANN, S.; AKALIN, E.; ANG, O.; BAL, C.; CASELLAS, J. M. Characterization of β -lactamase gene *bla*_{PER-2}, which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 3, p. 616-620, 1996.

BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. (Org.). **Doença das Aves**. 1. ed. Campinas: FACTA, 2000. p. 185-194.

BERTRAND, S.; WEILL, F. X.; CLOECKAERT, A.; VRINTS, M.; MAIRIAUX, E.; PRAUD, K.; DIERICK, K.; WILDEMAUVE, C.; GODARD, C.; BUTAYE, P.; IMBERECHTS, H.; GRIMONT, P. A. D.; COLLARD, J. M. Clonal emergence of extended-spectrum β -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). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2897-2903, 2006.

BOERLIN, P.; REID-SMITH, R. J. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 115-126, 2008.

BOGAERTS, P.; NAAS, T.; GARCH, F.E.; CUZON, G.; DEPLANO, A.; DELAIRE, T.; HUANG, T.D.; LISSOIR, B.; NORDMANN, P.; GLUPCZYNSKI, Y. GES extended spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4872-4878, 2010.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004.

BONNET, R.; DUTOUR, C.; SAMPAIO, J. L. M.; CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R.; CHAMPS, C.; SIROT, J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240→Gly. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2269–2275, 2001.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.

BRADFORD, P.A.; PETERSEN, P.J.; FINGERMAN, I.M.; WHITE, D.G. Characterization of expanded-spectrum cephalosporin resistance in *E. coli* isolates associated with bovine calf diarrhoeal disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 607-610, 1999.

BRADFORD, P.A.; YANG, Y.; SAHM, D.; GROPE, I.; GARDOVSKA, D.; STORCH, G. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 8, p. 1980-1984, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde: Módulo I – principais síndromes infecciosas**. Brasília, DF, 2004. 65 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Balança Comercial – Exportações brasileiras do agronegócio: União Européia 27**. Brasília, DF, 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/internacional/indicadores-e-estatisticas/balanca-comercial>>. Acesso em: 29 mai. 2012.

BRIÑAS, L.; MORENO, M.A.; ZARAZAGA, M.; PORRERO, C.; SÁENZ, Y.; GARCÍA, M.; DOMINGUEZ, L.; TORRES, C. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 β -lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 2056-2058, 2003.

BRIÑAS, L.; MORENO, M.A.; TESHAGER, T.; SÁENZ, Y.; PORRERO, M.C.; DOMINGUEZ, L.; TORRES, C. Monitoring and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 1262-1264, 2005.

BRUMANO, G; GATTÁS, G. Implicações sobre o uso de antimicrobianos em rações de monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 3, p. 953-959, 2009.

BUSH, K. New beta-lactamases en Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Disease**, v. 32, n. 7, p. 1085-1089, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 1211-1233, 1995.

BUTOLO, J. E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. 1. ed. Campinas: CBNA, 2002. p. 430.

BUTOLO, J. E. Uso de aditivos na alimentação de aves: frangos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE AS IMPLICAÇÕES SÓCIO-ECONÔMICAS DO USO DE ADITIVOS NA PRODUÇÃO ANIMAL, 1999, Piracicaba. **Anais...** Campinas: CBNA, 1999. p. 85-94.

CANTÓN, R.; COQUE, T. M. The CTX-M β -lactamase pandemic. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 466-475, 2006.

CANTÓN, R.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, p. 315-325, 2003.

CAO, V.; LAMBERT, T.; NHU, D. Q.; LOAN, H. K.; HOANG, N. K.; ARLET, G.; COURVALIN, P. Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3739-3743, 2002.

CARATTOLI, A. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, suppl. 1, p. 117-123, 2008.

CARRÈR, A.; POIREL, L.; YILMAZ, M.; AKAN, O. A.; FERIHA, C.; CUZON, G.; MATAR, G.; HONDERLICK, P.; NORDMANN, P. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1369-1373, 2010.

CASSONE, M.; GIORDANO, A. Resistance genes traveling the microbial internet: down the drain, up the food chain? **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 6, p. 637-639, 2009.

CASTANHEIRA, M.; DESHPANDE, L. M.; MATHAI, D.; BELL, J. M.; JONES, R. N.; MENDES, R. E. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1274-1278, 2011.

CELENZA, G.; PELLEGRINI, C.; CACCAMO, M.; SEGATORE, B.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M. Spread of *bla*_{CTX-M-type} and *bla*_{PER-2} β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 975-978, 2006.

CHANAWONG, A.; M'ZALI, F. H.; HERITAGE, J.; LULITANOND, A.; HAWKEY, P. M. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 839-852, 2001.

CHANG, F. Y.; SIU, L. K.; FUNG, C. P.; HUANG, M. H.; HO, M. Diversity of SHV and TEM beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: gene evolution in Northern Taiwan and two novel beta-lactamases, SHV-25 and SHV-26. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2407-2413, 2001.

CHARLTON, B. R.; WALKER, R. L.; KINDE, B. H.; BAUER, C. R.; CHANNING-SANTIAGO, S. E.; FARVER, T. B. Comparison of a *Salmonella* enteritidis-specific polymerase chain reaction assay to delayed secondary enrichment culture for the detection of *Salmonella* enteritidis in environmental drag swab samples. **Avian Diseases**, v. 49, n. 3, p. 418-422, 2005.

CHEN, L. F.; CHOPRA, T.; KAYE, K. S. Pathogens resistant to antibacterial agents. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, p. 817-845, 2009.

CLÍMACO, E. C. Caracterização molecular de genes *bla*_{CTX-M} presentes em *Klebsiella* spp. isoladas em um hospital universitário do Brasil. Ribeirão Preto, 2007. 88 p. : il. **Dissertação (mestrado)** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.

CLOECKAERT, A.; PRAUD, K.; DOUBLET, B.; BERTINI, A.; CARATTOLI, A.; BUTAYE, P.; IMBERECHTS, H.; BERTRAND, S.; COLLARD, J. M.; ARLET, G.; WEILL, F. X. Dissemination of an extended-spectrum- β -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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1872-1875, 2007.

CLOECKAERT, A.; PRAUD, K.; LEFEVRE, M.; DOUBLET, B.; PARDOS, M.; GRANIER, S. A.; BRISABOIS, A.; WEILL, F. X. IncI1 plasmid carrying extended-spectrum- β -lactamase gene *bla*_{CTX-M-1} in *Salmonella enterica* isolates from poultry and humans in France, 2003 to 2008. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4484-4486, 2010.

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute (Wayne, PA, USA). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing** – Twenty-First Informational Supplement M100-S21. Clinical Laboratory Standards Institute, v. 31, n. 1, 2011.

COHEN, J. I.; BARTLETT, J. A.; COREY, G. R. Extra-intestinal manifestations of *Salmonella* infections. **Medicine**, v. 66, p. 349-388, 1987.

COLLIS, C. M.; HALL, R. M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 1, p. 155-162, 1995.

CORKILL, J. E.; CUEVAS, L. E.; GURGEL, R. Q.; GREENSILL, J.; HART, C. A. SHV-27, a novel cefotaxime-hydrolysing β -lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 4630-465, 2001.

CORNAGLIA, G.; GARAU, J.; LIVERMORE, D. M. Living with ESBLs. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, suppl. 1, p. 1-2, 2008.

CORNELI, J. Avaliação de promotores de crescimento alternativos em substituição aos convencionais sobre o desempenho, características de carcaça e morfometria intestinal em frangos de corte. Santa Maria, 2004. 58 p. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Federal de Santa Maria, 2004.

COSTA, D.; POETA, P.; SÁENZ, Y.; VINUÉ, L.; ROJO-BEZARES, B.; JOUINI, A.; ZARAZAGA, M.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 1311-1312, 2006.

D'AOUST, J. Y. **Salmonella**. In: DOYLE, M. P. Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker, 1989. cap. 9, p. 327-445.

DALLENNE, C.; DA COSTA, A.; DECRÉ, D.; FAVIER, C.; ARLET, G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 490-495, 2010.

DANIELS, N. A.; MACKINNON, L.; ROWE, S. M.; BEAN, N. H.; GRIFFIN, P. M.; MEAD, P. S. Foodborne disease outbreaks in United States schools. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 21, n. 7, p. 623-628, 2002.

DE VRIES, J. J. C.; BAAS, W. H.; PLOEG, K. V. D.; HEESINK, A.; DEGENER, J. E.; ARENDS, J. P. Outbreak of *Serratia marcescens* colonization and infection traced to a healthcare worker with long-term carriage on the hands. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 27, n. 11, p. 1153-1158, 2006.

DO CARMO FILHO, J. R.; SILVA, R. M.; CASTANHEIRA, M.; TOGNIM, M. C.; GALES, A. C.; SADER, H. S. Prevalence and genetic characterization of *bla*_{CTX-M} among *Klebsiella pneumoniae* isolates collected in an intensive care unit in Brazil. **Journal of Chemotherapy**, v. 20, n. 5, p. 600-603, 2008.

DRASAR, B. S.; HILL, M. J. **Human intestinal flora**. London: Academic Press Ltd., 1974. p. 36-43.

DUARTE, A.; BOAVIDA, F.; GROSSO, F.; CORREIA, M.; LITO, L. M.; CRISTINO, J. M.; SALGADO, M. J. Outbreak of GES-1 β -lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a University Hospital in Lisbon, Portugal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1481-1482, 2003.

EDELSTEIN, M.; PIMKIN, M.; PALAGIN, I.; EDELSTEIN, I.; STRATCHOUNSKI, L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3724-3732, 2003.

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

ENSOR, V.; WARREN, R.; O'NEILL, P.; BUTLER, V.; TAYLOR, J.; NYE, K.; HARVEY, M.; LIVERMORE, D.; WOODFORD, N.; HAWKEY, P. Isolation of quinolone-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from raw chicken meat sold in retail outlets in the West Midlands, UK. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, suppl. 1, p. S274-S275, 2007.

EUA (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA). Food and Drug Administration. **NARMS Retail Meat Annual Report**. Silver Spring, 2006. 100 p. Disponível em: <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/ucm061975.htm>>. Acesso em: 29 mai. 2012.

EUA (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA). Food and Drug Administration. *Salmonella*. In: ANDREWS, W. H; HAMMACK, T. S. **Bacteriological Analytical Manual Online**. Silver Spring, 2007. chapter 5. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>>. Acesso em: 11 abr. 2012.

EUA (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA). Food Safety and Inspection Service. **Salmonella Enteritidis risk assessment** – Shell Eggs and Egg Products. Washington, DC, 1998. 268 p. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/ohs/risk/contents.htm>>. Acesso em: 29 mai. 2012.

EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Basel, Suíça). **Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters**. EUCAST, v. 2, 2011. Disponível em: <http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/>. Acesso em: 29 mai. 2012.

FAAIR SCIENTIFIC ADVISORY PANEL. Policy Recommendations. In: Barza, M., Gorbach, S.L. (Eds.), The Need to Improve Antimicrobial Use in Agriculture: Ecological and Human Health Consequences. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, suppl. 3, p. S76-S77, 2002.

FABRE, L.; DELAUN, A.; ESPIÉ, E.; NYGARD, K.; PARDOS, M.; POLOMACK, L.; GUESNIER, F.; GALIMAND, M.; LASSEN, J.; WEILL, F. X. Chromosomal integration of the extended-spectrum β -lactamase gene *bla*_{CTX-M-15} in *Salmonella enterica* serotype Concord isolates from internationally adopted children. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 1808-1816, 2009.

FARIA, D. E.; HENRIQUE, A. P. F.; FRANZOLIN NETO, R.; MEDEIROS, A. A.; JUNQUEIRA, O. M.; FARIA FILHO, D. E. Alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte: 1. probióticos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2009.

FERNÁNDEZ, A. G.; CLOECKAERT, A.; BERTINI, A.; PRAUD, K.; DOUBLET, B.; WEILL, F. X.; CARATTOLI, A. Comparative analysis of IncHI2 plasmids carrying *bla*_{CTX-M-2} or *bla*_{CTX-M-9} from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains isolated from poultry and humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 4177-4180, 2007.

FERREIRA, A. J. P.; ITO, N. M. K.; BENEZ, S. M. Infecção natural e experimental por *Salmonella enteritidis* em pintos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1990, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1990. p. 171.

FEY, P. D.; SAFRANEK, T. J.; RUPP, M. E.; DUNNE, E. F.; RIBOT, E.; IWEN, P. C.; BRADFORD, P. A.; ANGULO, F. J.; HINRICHS, S. H. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 17, p. 1242-1249, 2000.

FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Resistance integrons and super-integrons. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 4, p. 272-288, 2004.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. E173-E187, 2008.

FRACALANZZA, S. A. P.; SCHEIDEGGER, E. M. D.; SANTOS, P. F.; LEITE, P. C.; TEIXEIRA, L. M. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 853-859, 2007.

FRANCO, R. M.; MANTILLA, S. P. S. *Escherichia coli* em corte de carne bovina (acém): avaliação de metodologia e sensibilidade antimicrobiana ao sorovares predominantes. In: XIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 2004. 1 CD-ROM.

GARCIA, D. O.; DOI, Y.; SZABO, D.; ADAMS-HADUCH, J. M.; VAZ, T. M. I.; LEITE, D.; PADOVEZE, M. C.; FREIRE, M. P.; SILVEIRA, F. P.; PATERSON, D. L. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1790-1793, 2008.

GAST, R. K. **Paratyphoid infections**. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; MCDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. Diseases of Poultry. 10. ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. p. 97-129.

GAST, R. K.; STEPHENS, J. F. *In vivo* transfer of antibiotic resistance to a strain of *Salmonella arizonae*. **Poultry Science**, v. 65, p. 270-279, 1986.

GIAKKOUPIS, P.; TZOUVELEKIS, L. S.; TSAKRIS, A.; LOUKOVA, V.; SOFIANOU, D.; TZELEPI, E. IBC-1, a novel integron-associated class A β -lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2247-2253, 2000.

GILL, C. O.; BADONI, M.; JONES, T. Hygienic effects of trimming and washing operations in a beef-carcass-dressing process. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 6, p. 666-669, 1996.

GIRLICH, D.; NAAS, T.; LEELAPORN, A.; POIREL, L.; FENNEWALD, M.; NORDMANN, P. Nosocomial spread of the integron-located *veb-1*-like cassette encoding an extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 603-611, 2002.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; CARATTOLI, A.; KEMPF, I.; LARTIGUE, M. F.; BERTINI, A.; NORDMANN, P. Extended-spectrum β -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4681-4685, 2007.

GISKE, C. G.; SUNDSFJORD, A. S.; KAHLMETER, G.; WOODFORD, N.; NORDMANN, P.; PATERSON, D. L.; CANTÓN, R.; WALSH, T. R. Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 1-4, 2009.

GOMES, D. M. Resíduos de antibióticos promotores de crescimento em produtos de origem animal. Brasília, 2004. 69 p. **Monografia (especialização)**. Centro de Excelência em Turismo, Qualidade de Alimentos, Universidade de Brasília, 2004.

GUPTA, S. K.; NALLUSWAMI, K.; SNIDER, C.; PERCH, M.; BALASEGARAM, M.; BURMEISTER, D.; LOCKETT, J.; SANDT, C.; HOEKSTRA, R. M.; MONTGOMERY, S. Outbreak of *Salmonella* Braenderup infections associated with Roma tomatoes, northeastern United States, 2004: a useful method for subtyping exposures in field investigations. **Epidemiology and Infection**, v. 135, n. 7, p. 1165-1173, 2007.

GYLES, C. L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 149-158, 2008.

HÆGGMAN, S.; LOFDAHL, S.; PAAUW, A.; VERHOEF, J.; BRISSE, S. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2400-2408, 2004.

HALL, L. M. C.; LIVERMORE, D. M.; GUR, D.; AKOVA, M.; AKALIN, H. E. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 8, p. 1637-1644, 1993.

HARADA, S.; ISHII, Y.; SAGA, T.; KOUYAMA, Y.; TATEDA, K.; YAMAGUCHI, K. Chromosomal integration and location on IncT plasmids of the *bla*_{CTX-M-2} gene in *Proteus mirabilis* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1093-1096, 2012.

HASMAN, H.; MEVIUS, D.; VELDMAN, K.; OLESEN, I.; AARESTRUP, F. M. β -lactamases among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 115-121, 2005.

HAWKEY, P. M. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. S406-S413, 2008a.

HAWKEY, P. M. The growing burden of antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, suppl. 1, p. i1-i9, 2008b.

HERITAGE, J.; M'ZALI, F. H.; GASCOYNE-BINZI, D.; HAWKEY, P. M. Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 309-318, 1999.

HERNÁNDEZ, J. R.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; CANTÓN, R.; COQUE, T. M.; PASCUAL, A.; SPANISH GROUP FOR NOSOCOMIAL INFECTIONS (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 2122-2125, 2005.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). **Microorganisms in Foods, 6** – Microbial Ecology of Food Commodities. 2. ed. New York: Kluwer Academic & Plenum Publishers, 2005. cap. 1, p 1-106.

ISENBERG, H. D. **Broth Microdilution MIC test**. In: H. D. ISENBERG, H. D. (Ed.) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2. ed. Washington, DC: ASM press, 2004. cap 5, seção 2.1-2.14.

JACOBY, G. A. AmpC β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161-182, 2009.

JACOBY G. A.; BUSH, K. **β -lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes**. Burlington, 2012. Disponível em: <<http://www.lahey.org/Studies/>>. Acesso em: 29 mai. 2012.

JACOBY G. A.; BUSH, K. β -lactamase nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 6220, 2005.

JACOBY, G. A.; CARRERAS, I. Activities of beta-lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 5, p. 858-62, 1990.

JACOBY G. A.; MUÑOZ-PRICE, L. S. The new β -lactamases. **New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 380-391, 2005.

JAY, J. M. (Ed.). **Modern Food Microbiology**. 6. ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. pp.1-53, 170 e 363-420.

JEONG, S. H.; BAE, I. K.; KIM, D.; HONG, S. G.; SONG, J. S.; LEE, J. H.; LEE, S. H. First Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum β -lactamases in Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4809-4810, 2005.

JIANG, X.; NI, Y.; JIANG, Y.; YUAN, F.; HAN, L.; LI, M.; LIU, H.; YANG, L.; LU, Y. Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 beta-lactamase in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 826-831, 2005.

JOUINI, A.; VINUÉ, L.; SLAMA, K. B.; SÁENZ, Y.; KLIBI, N.; HAMMAMI, S.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum β -lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 1137-1141, 2007.

KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 469-473, 2008.

KAISER, P.; HARDT, W. D. *Salmonella* Typhimurium diarrhea: switching the mucosal epithelium from homeostasis to defense. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, p. 456-463, 2011.

KARAMI, N.; MARTNER, A.; ENNE, V. I.; SWERKERSSON, S.; ADLERBERTH, I.; WOLD, A. E. Transfer of an ampicillin resistance gene between two *Escherichia coli* strains in the bowel microbiota of an infant treated with antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 1142-1145, 2007.

KARTALI, G.; TZELEPI, E.; POURNARAS, S.; KONTOPOULOU, C.; KONTOS, F.; SOFIANOU, D.; MANIATIS, A. N.; TSAKRIS, A. Outbreak of infections caused by *Enterobacter cloacae* producing the integron-associated β -lactamase IBC-1 in a neonatal intensive care unit of a Greek hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1577-1580, 2002.

KICH, J. D.; COLDEBELLA, A.; MORÉS, N.; NOGUEIRA, M. G.; CARDOSO, M.; FRATAMICO, P. M.; CALL, J. E.; FEDORKA-CRAY, P.; LUCHANSKY, J. B. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 307-313, 2011.

KIM, J. Y.; PARK, Y. J.; KIM, S. I.; KANG, M. W.; LEE, S. O.; LEE, K. Y. Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in a Korean university hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 1144-1147, 2004.

KIM, S. H.; WEI, C. I.; AN, H. Molecular characterization of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates from retail meat products. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 7, p. 1408-1413, 2005.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KROMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315-317, 1983.

KOJIMA, A.; ISHII, Y.; ISHIHARA, K.; ESAKI, H.; ASAI, T.; ODA, C.; TAMURA, Y.; TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, K. Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3533-3537, 2005.

KOLAYLI, F.; GACAR, G.; KARADENIZLI, A.; SANIC, A.; VAHABOGLU, H.; THE STUDY GROUP. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, p. 241-245, 2005.

KRUSE, H.; SORUM, H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 4015-4021, 1994.

LEAVITT, A.; NAVON-VENEZIA, S.; CHMELNITSKY, I.; SCHWABER, M.; CARMELI, Y. Emergence of KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 3026-3029, 2007.

LEITE, A. M. 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.; DIERIKX, C. M.; STUART, J. C.; VOETS, G. M.; VAN DEN MUNCKHOF, M. P.; VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A.; PLATTEEL, T.; FLUIT, A. C.; VAN DE SANDE-BRUIJNSMA, N.; SCHARINGA, J.; BONTEN, M. J. M.; MEVIUS, D. J. 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, 2011.

MINARINI, L. A.; CLÍMACO, E. C.; GUIMARÃES, D. B.; FERREIRA, J. C.; PALAZZO, I. C.; MARTINEZ, R.; DARINI, A. L. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella* spp. at a university hospital in Brazil. **Current Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 587-591, 2008.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LI, W.; RAOULT, D.; FOURNIER, P. E. Bacterial strain typing in the genomic era. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, p. 892-916, 2009.

LI, X. Z.; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S.; ADEWOYE, L. β -lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p. 197-214, 2007.

LIEBANA, E.; BATCHELOR, M.; HOPKINS, K. L.; CLIFTON-HADLEY, F. A.; TEALE, C. J.; FOSTER, A.; BARKER, L.; THRELFALL, E. J.; DAVIES, R. H. Longitudinal farm study of extended-spectrum β -lactamase-mediated resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1630-1634, 2006.

LINCOPAN, N.; McCULLOCH, J. A.; REINERT, C.; CASSETTARI, V. C.; GALES, A. C.; MAMIZUKA, E. M. First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 516-519, 2005.

LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 557-584, 1995.

MACHADO, E.; COQUE, T. M.; CANTÓN, R.; SOUSA, J. C.; PEIXE, L. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 296-302, 2008.

MADEC, J. Y.; LAZIZZERA, C.; CHÂTRE, P.; MEUNIER, D.; MARTIN, S.; LEPAGE, G.; MÉNARD, M. F.; LEBRETON, P.; RAMBAUD, T. Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-spectrum cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae strains from cattle in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1566-1567, 2008.

MATSUBARA, E. N. Condição higiênico-sanitária de meias-carcaças de suínos após o abate e depois do resfriamento e análise da utilização de lista de verificação para avaliar boas práticas no abate de suínos. São Paulo, 2005. 152 f. : il. **Dissertação (mestrado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2005.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BREESE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 607-625, 1999.

MEDEIROS, A. A.; CRELLIN, J. Comparative susceptibility of clinical isolates producing extended-spectrum beta-lactamases to ceftibuten: effect of a large inoculum. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 16, p. S49-S55, 1997.

MEDEIROS, M. A. N.; OLIVEIRA, D. C. N.; RODRIGUES, D. P.; FREITAS, D. R. C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 30, n. 6, p. 555-560, 2011.

MENDES, C.; KIFFER, C.; SEGURA, A.; RIBEIRO, J.; TURNER, P. *Klebsiella pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, n.1, p.109-111. 2004.

MENG, J.; DOYLE, M. P.; ZHAO, T.; ZHAO, S. **Enterohemorrhagic *Escherichia coli***. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Eds.). Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 2. ed. Washington, DC: ASM Press, 2001. p. 193-213.

MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of multiresistant porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Bredeney isolates from Southern Brazil: identification of resistance genes, integrons and a group II intron. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 120-129, 2008.

MINARINI, L. A. R.; GALES, A. C.; DARINI, A. L. C. First report of plasmid-mediated resistance to quinolones and cefotaxime in an *Enterobacter cloacae* strain isolated from an outpatient in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 401-402, 2007.

MIRIAGOU, V.; TZOUVELEKIS, L. S.; ROSSITER, S.; TZELEPI, E.; ANGULO, F. J.; WHICHARD, J. M. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1297-1300, 2003.

MIRÓ, E.; MIRELIS, B.; NAVARRO, F.; RIVERA, A.; MESA, R. J.; ROIG, M. C.; GÓMEZ, L.; COLL, P. Surveillance of extended-spectrum β -lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 1152-1155, 2005.

MOELLERING JR., R. C. Problems with antimicrobial resistance in gram-positive cocci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, n. 5, p. 1177-1178, 1998.

MOLAND, E. S.; BLACK, J. A.; OURADA, J.; REISBIG, M. D.; HANSON, N. D.; THOMSON, K. S. Occurrence of newer β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U.S. hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3837-3842, 2002.

MOROSINI, M. I.; CANTÓN, R.; MARTÍNEZ-BELTRAN, J.; NEGRI, M. C.; PEREZ-DIAZ, J. C.; BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. New extended-spectrum TEM-type β -lactamase from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated in a nosocomial outbreak. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 2, p. 458-461, 1995.

MORRIS, D.; O'HARE, C.; GLENNON, M.; MAHER, M.; CORBETT-FEENEY, G.; CORMICAN, M. Extend-spectrum β -lactamases in Ireland, including a novel enzyme, TEM-102. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 2572-2578, 2003.

MOUBARECK, C.; BRÉMONT, S.; CONROY, M. C.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3579-3581, 2009.

NAAS, T.; BOGAERTS, P.; BAURAIN, C.; DEGHELDRE, Y.; GLUPCZYNSKI, Y.; NORDMANN, P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 178-182, 2006a.

NAAS, T.; COIGNARD, B.; CARBONNE, A.; BLANCKAERT, K.; BAJOLET, O.; BERNET, C.; VERDEIL, X.; ASTAGNEAU, P.; DESENCLOS, J. C.; NORDMANN, P. VEB-1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1214-1222, 2006b.

NAAS, T.; MIKAMI, Y.; IMAI, T.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 235-249, 2001.

NAAS, T.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Minor extended-spectrum β -lactamases. **Clinical Microbiology and Infections**, v. 14, suppl. 1, p. 42-52, 2008.

NAAS, T.; VANDEL, L.; SOUGAKOFF, W.; LIVERMORE, D. M.; NORDMANN, P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 6, p. 1262-1270, 1994.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). **Basic Local Alignment Search Tool**. Bethesda, 2012. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 29 mai. 2012.

NEWELL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F. Food-borne diseases – the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, suppl. 1; p. S13-S15, 2010.

NOGUEIRA, K. S. Prevalência e caracterização molecular de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) em enterobactérias isoladas no Hospital de Clínicas de Curitiba. Curitiba, 2011. 167 p. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Federal do Paraná, 2011.

NOGUEIRA, K. S.; DAUR, A. V.; REASON, I. T. M.; GALES, A. C.; COSTA, L. M. D. Cefepime versus extended spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 15, n. 2, p. 167-169, 2011.

NORDMANN, P.; NAAS, T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 1, p. 104-114, 1994.

NORDMANN, P.; RONCO, E.; NAAS, T.; DUPORT, C.; MICHEL-BRIAND, Y.; LABIA, R. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 962-969, 1993.

NÜESCH-INDERBINEN, M. T.; KAYSER, F. H.; HÄCHLER, H. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 5, p. 943-949, 1997.

O'BRIEN, T. F. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, suppl. 3, p. S78-84, 2002.

OLIVER, A.; COQUE, T. M.; ALONSO, D.; VALVERDE, A.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R. CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1567-1571, 2005.

OUELLETTE, M.; BISSONNETTE, L.; ROY, P. H. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, p. 7378-7382, 1987.

PAN, Y. J.; FANG, H. C.; YANG, H. C.; LIN, T. L.; HSIEH, P. F.; TSAI, F. C.; KEYNAN, Y.; WANG, J. T. Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2231-2240, 2008.

PASTERÁN, F.; RAPOPORT, M.; PETRONI, A.; FACCONI, D.; CORSO, A.; GALAS, M.; VÁZQUEZ, M.; PROCOPIO, A.; TOKUMOTO, M.; CAGNONI, V. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in the Americas. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 3222-3224, 2006.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.

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

PELLEGRINI, C.; MERCURI, P. S.; CELENZA, G.; GALLENI, M.; SEGATORE, B.; SACCHETTI, E.; VOLPE, R.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M. Identification of *bla*_{IMP-22} in *Pseudomonas* spp. in urban wastewater and nosocomial environments: biochemical characterization of a new IMP metallo-enzyme variant and its genetic location. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 901-908, 2009.

PENG, Y.; JIN, J.; WU, C.; YANG, J.; LI, X. Orthogonal array design in optimizing ERIC-PCR system for fingerprinting rat's intestinal microflora. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2095-2101, 2007.

PERESI, J. T. M. Perfil epidemiológico dos surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, elucidados laboratorialmente, ocorridos na região Noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003 e susceptibilidade das cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* aos agentes antimicrobianos. São José do Rio Preto, 2004. 130 p. **Dissertação (mestrado)** – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2004.

PESSANHA, R. P., GONTIJO FILHO, P. P. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isoaldos de *Escherichia coli* e de Enterobacteriaceae lactose-negativa de microflora fecal de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 1, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000100018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 20 out. 2011.

PETRONI, A.; CORSO, A.; MELANO, R.; CACACE, M. L.; BRU, A. M.; ROSSI, A.; GALAS, M. Plasmidic extended-spectrum β -lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 6, n. 5, p. 1462-1468, 2002.

PHILIPPON, L. N.; NAAS, T.; BOUTHORS, A. T.; BARAKETT, V.; NORDMANN, P. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 10, p. 2188-2195, 1997.

PITOUT, J. D. D. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. **Expert Reviews of Anti-infective Therapy**, v. 6, p. 657-669, 2008.

PITOUT, J. D. D.; HOSSAIN, A.; HANSON, N. D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5715-5721, 2004.

PITOUT, J. D. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 159-166, 2008.

PITOUT, J. D. D.; REVATHI, G.; CHOW, B. L.; KABERA, B.; KARIUKI, S.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 755-759, 2008.

POIREL, L.; BRIÑAS, L.; FORTINEAU, N.; NORDMANN, P. Integron-encoded GES-type extended-spectrum β -lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3593-3597, 2005.

POIREL, L.; CASTANHEIRA, M.; CARRÈR, A.; RODRIGUEZ, C. P.; JONES, R. N.; SMAYEVSKY, J.; NORDMANN, P. OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 2546-2551, 2011.

POIREL, L.; NAAS, T.; GUIBERT, M.; CHAIBI, E. B.; LABIA, R.; NORDMANN, P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 3, p. 573-581, 1999.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 24-38, 2010.

POIREL, L.; NAAS, T.; THOMAS, I. L.; KARIM, A.; BINGEN, E.; NORDMANN, P. CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 12, p. 3355-3361, 2001b.

POIREL, L.; THOMAS, I. L.; NAAS, T.; KARIM, A.; NORDMANN, P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 622-632, 2000.

POIREL, L.; WELDHAGEN, G. F.; DE CHAMPS, C.; NORDMANN, P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum β -lactamase GES-2 in South Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 561-565, 2002.

POIREL, L.; WELDHAGEN, G. F.; NAAS, T.; DE CHAMPS, C.; DOVE, M. G.; NORDMANN, P. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2598-2603, 2001a.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMTIHL, J.; HICKMAN-BRENNER, F. W. Supplement 1994 (n° 38) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v. 146, p. 799-803, 1995.

POPPE, C.; MARTIN, L. C.; REID-SMITH, R.; BOERLIN, P.; McEWEN, S. A.; PRESCOTT, J. F.; FORWARD, K. R. Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* serovar Newport and *Escherichia coli* in the turkey poult intestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1184-1192, 2005.

POUPART, M. C.; CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R.; SIROT, J. Identification of CTX-2, a novel cefotaximase from a *Salmonella mbandaka* isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 7, p. 1498-1500, 1991.

PRESCOTT, J. F. Antimicrobial use in food and companion animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 127-133, 2008.

PRICE, L. B.; GRAHAM, J. P.; LACKEY, L. G.; ROESS, A.; VAILES, R.; SILBERGELD, E. Elevated risk of carrying gentamicin-resistant *Escherichia coli* among U.S. poultry workers. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 12, p. 1738-1742, 2007.

PRUIMBOOM-BRESS, I. M.; MORGAN, T. W.; ACKERMANN, M. R.; NYSTROM, E. D.; SAMUEL, J. E.; A. CORNICK, N. A.; MOON, H. W. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 shiga toxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 19, p. 10325-10329, 2000.

QUINTEROS, M.; RADICE, M.; GARDELLA, N.; RODRIGUEZ, M. M.; COSTA, N.; KORBENFELD, D.; COUTO, E.; GUTKIND, G.; THE MICROBIOLOGY STUDY GROUP. Extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 9, p. 2864-2867, 2003.

RABSCH, W.; TSCHÄPE, H.; BÄUMLER, A. J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 237-247, 2001.

RADICE, M.; POWER, P.; DI CONZA, J.; GUTKIND, G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 602-604, 2002.

RASHEED, J. K.; JAY, C.; METCHOCK, B.; BERKOWITZ, F.; WEIGEL, L.; CRELLIN, J.; STEWARD, C.; HILL, B.; MEDEIROS, A. A.; TENOVER, F. C. Evolution of extended-spectrum β -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 647-653, 1997.

RASMUSSEN, B. A.; BUSH, K.; KEENEY, D.; YANG, Y.; HARE, R.; O'GARA, C.; MEDEIROS, A. A. Characterization of IMI-1 β -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 9, p. 2080-2086, 1996.

RAYAMAJHI, N.; JUNG, B. Y.; CHA, S. B.; SHIN, M. K.; KIM, A.; KANG, M. S.; LEE, K. M.; YOO, H. S. Antibiotic resistance patterns and detection of *bla*_{DHA-1} in *Salmonella* species isolates from chicken farms in South Korea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 14, p. 4760-4764, 2010.

REVATHI, G.; SHANNON, K. P.; STAPLETON, P. D.; JAIN, B. K.; FRENCH, G. L. An outbreak of extended-spectrum, β -lactamase-producing *Salmonella seftenberg* in a burns ward. **Journal of Hospital Infection**, v. 40, p. 295-302, 1998.

RHOADES, J. R.; DUFFY, G.; KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. **Food Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 357-376, 2009.

RIAÑO, I.; MORENO, M. A.; TESHAGER, T.; SÁENZ, Y.; DOMÍNGUEZ, L.; TORRES, C. Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 844-847, 2006.

ROE, M. T.; PILLAI, S. D. Monitoring and identifying antibiotic resistance mechanisms in bacteria. **Poultry Science**, v. 82, p. 622-626, 2003.

ROMERO, L.; LÓPEZ, L.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; HERNÁNDEZ, J. R.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, R.; PASCUAL, A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 8, p. 625-631, 2005.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Bacilos Gram-negativos: Beta-lactamases**. In: ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 5. p. 68-71.

SPINOSA, H. S. **Considerações gerais sobre os antimicrobianos**. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (Org.). Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 379-385.

SALADIN, M.; CAO, V. T.; LAMBERT, T.; DONAY, J. L.; HERRMANN, J. L.; OULD-HOCINE, Z.; VERDET, C.; DELSILE, F.; PHILIPPON, A.; ARLET, G. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, p. 161-168, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; FLORES, M. L.; ROSEK, H.; D'ANDREA, A.; ALBUQUERQUE, M. C.; RAMPANELLI, Y.; MACHADO, N. P.; RIOS, S.; FERNANDES, S. A. *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 102/103, p. 93-99, 2002.

SCHJØRRING, S.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A. Transfer of antimicrobial resistance plasmids from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in the mouse intestine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 1086-1093, 2008.

SEOL, S. Y.; KIM, Y. T.; JEONG, Y. S.; OH, J. Y.; KANG, H. Y.; MOON, D. C.; KIM, J.; LEE, Y. C.; CHO, D. T.; LEE, J. C. Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Shigella sonnei* isolates in Korea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 871-877, 2006.

SEVILLANO, E.; VALDERREY, C.; CANDUELA, M. J.; UMARAN, A.; CALVO, F.; GALLEGU, L. Resistance to antibiotics in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Pathologie Biologie**, v. 54, p. 493-497, 2006.

SHIRAKI, Y.; SHIBATA, N.; DOI, Y.; ARAKAWA, Y. *Escherichia coli* producing CTX-M-2 β -lactamase in cattle, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 69-75, 2004.
SILVA, Z. N.; CUNHA, A. S.; LINS, M. C.; CARNEIRO, L. A. M.; ALMEIDA, A. C. F.; QUEIROZ, M. L. P. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 4, p. 375-379, 2001.

SIROT, D.; SIROT, J.; LABIA, R.; MORAND, A.; COURVALIN, P.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; PERROUX, R.; CLUZEL, R. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 20, p. 323-334, 1987.

SLAMA, T. G. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. **Critical Care**, v. 12, suppl. 4, p. 1-7, 2008.

SMET, A.; MARTEL, A.; PERSOONS, D.; DEWULF, J.; HEYNDRICKX, M.; CATRY, B.; HERMAN, L.; HAESBROUCK, F.; BUTAYE, P. Diversity of extended-spectrum β -lactamases and class C β -lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1238-1243, 2008.

SMET, A.; MARTEL, A.; PERSOONS, D.; DEWULF, J.; HEYNDRICKX, M.; HERMAN, L.; HAESBROUCK, F.; BUTAYE, P. Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. **FEMS Microbiology Reviews**, [Epub ahead of print], p. 1-22, 2009.

SNOEYENBOS, G. H.; WILLIAMS, J. E. **Salmonellosis**. In: B. W. CALNEK (Ed.). Diseases of Poultry. 9. ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. p. 72-73.

SONCINI, R. A. Restrições do uso de aditivos na alimentação animal: expectativa da agroindústria. In: SIMPÓSIO SOBRE IMPLICAÇÕES SOCIOECONÔMICAS DO USO DE ADITIVOS NA PRODUÇÃO ANIMAL, 1999, Piracicaba. **Anais...** Campinas: CBNA, 1999. p. 99-104.

SOUFI, L.; ABBASSI, M. S.; SÁENZ, Y.; VINUÉ, L.; SOMALO, S.; ZARAZAGA, M.; ABBAS, A.; DBAYA, R.; KHANFIR, L.; HASSEN, A. B.; HAMMAMI, S.; TORRES, C. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 9, p. 1067-1073, 2009.

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

SPINOSA, H. S. **Considerações gerais sobre os antimicrobianos**. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (Org.). Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 379-385.

STRUELENS, M. J. The epidemiology of antimicrobial resistance in hospital acquired infections problems and possible solutions. **British Medical Journal**, v. 317, p. 652-654, 1998.

SU, L. H.; CHIU, C. H.; CHU, C.; WANG, M. H.; CHIA, J. H.; WU, T. L. *In vivo* acquisition of ceftriaxone resistance in *Salmonella enterica* serotype Anatum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 563-567, 2003.

TALBOT, G. H.; BRADLEY, J.; EDWARDS JR., J. E.; GILBERT, D.; SCHELD, M.; BARTLETT, J. G. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 657-668, 2006.

TASSIOS, P. T.; GAZOULI, M.; TZELEPI, E.; MILCH, H.; KOZLOVA, N.; SIDORENKO, S.; LEGAKIS, N. J.; TZOUVELEKIS, L. S. Spread of a *Salmonella typhimurium* clone resistant to expanded-spectrum cephalosporins in three European Countries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3774-3777, 1999.

TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 5, p. 315-322, 1996.

THI, P. L. N.; YASSIBANDA, S.; AIDARA, A.; LE BOUGUÉNEC, C.; GERMANI, Y. Enteropathogenic *Klebsiella pneumoniae* HIV-infected adults, Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 135-137, 2003.

TIAN, G. B.; WANG, H.N.; ZOU, L.K.; TANG, J.N.; ZHAO, Y.W.; YE, M.Y.; TANG, J.Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, A.Y.; YANG, X.; XU, C.W.; FU, Y.J. 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, 2009.

TIAN, S. F.; CHEN, B. Y.; CHU, Y. Z.; WANG, S. Prevalence of rectal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* among elderly people in community settings in China. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 781-785, 2008.

TODD, E. C. D. Epidemiology of foodborne diseases: a worldwide review. **World Health Statistics**, v. 50, p. 30-50, 1997.

TOLEMAN, M. A.; BENNETT, P. M.; WALSH, T. R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 296-316, 2006.

TOLEMAN, M. A.; ROLSTON, K.; JONES, R. N.; WALSH, T. R. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 9, p. 2859-2863, 2003.

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

TRANIER, S.; BOUTHORS, A. T.; MAVEYRAUD, L.; GUILLET, V.; SOUGAKOFF, W.; SAMAMA, J. P. The high resolution crystal structure for class A β -lactamase PER-1 reveals the bases for its increase in breadth of activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 36, p. 28075-28082, 2000.

VAHABOGLU, H.; HALL, L. M. C.; MULAZIMOGLU, L.; DODANLI, S.; YILDIRIM, I.; LIVERMORE, D. M. Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 β -lactamase, in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. **Journal of Medical Microbiology**, v. 43, p. 294-299, 1995.

VIGNOLI, R.; VARELA, G.; MOTA, M. I.; CORDEIRO, N. F.; POWER, P.; INGOLD, E.; GADEA, P.; SIROK, A.; SCHELOTTO, F.; AYALA, J. A.; GUTKIND, G. Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum β -lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2940-2943, 2005.

VILLA, L.; PEZZELLA, C.; TOSINI, F.; VISCA, P.; PETRUCCA, A.; CARATTOLI, A. Multiple-antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmids carrying an extended-spectrum β -lactamase gene and a class 1 integron. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2911-2914, 2000.

VOETSCH, A. C.; VAN GILDER, T. J.; ANGULO, F. J.; FARLEY, M. M.; SHALLOW, S.; MARCUS, R.; CIESLAK, P. R.; DENEEN, V. C.; TAUXE, R. V. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, suppl. 3, p. S127-134, 2004.

WALSH, C.; DUFFY, G.; NALLY, P.; O'MAHONEY, R.; McDOWELL, D. A.; FANNING, S. Transfer of ampicillin resistance from *Salmonella* Typhimurium DT104 to *Escherichia coli* K12 in food. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 210-215, 2008.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum β -lactamases. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 137-165, 2004.

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

WEDEL, S. D.; BENDER, J. B.; LEANO, F. T.; BOXRUD, D. J.; HEDBERG, C.; SMITH, K. E. Antimicrobial-drug susceptibility of human and animal *Salmonella* Typhimurium, Minnesota, 1997–2003. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1899-1906, 2005.

WEILL, F. X.; LAILLER, R.; PRAUD, K.; KÉROUANTON, A.; FABRE, L.; BRISABOIS, A.; GRIMONT, P. A. D.; CLOECKAERT, A. Emergence of extended-spectrum- β -lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5767-5773, 2004.

WHICHARD, J. M.; MEDALLA, F.; HOEKSTRA, R. M.; McDERMOTT, P. F.; JOYCE, K.; CHILLER, T.; BARRETT, T. J.; WHITE, D. G. 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. 445-451, 2010.

WHITE, P. A.; McIVER, C. J.; RAWLINSON, W. D. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2658-2661, 2001.

WHO – World Health Organization (Genebra, Suíça). **WHO Policy Perspectives on Medicine**: Containing antimicrobial resistance. Genebra, 2001. 6p. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js7920e/>>. Acesso em: 29 mai. 2012.

WINN, W. C. J.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E. W.; PROCOP, G. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

WINOKUR, P. L.; BRUEGGEMANN, A.; DESALVO, D. L.; HOFFMANN, L.; APLEY, M. D.; UHLENHOPP, E. K.; PFALLER, M. A.; DOERN, G. V. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2777-2783, 2000.

WINOKUR, P. L.; VONSTEIN, D. L.; HOFFMAN, L. J.; UHLENHOPP, E. K.; DOERN, G. V. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC β -lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 10, p. 2716-2722, 2001.

XU, H.; DAVIES, J.; MIAO, V. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 17, p. 6276-6283, 2007.

YAN, J. J.; CHIOU, C. S.; LAUDERDALE, T. L. Y.; TSAI, S. T.; WU, J. J. Cephalosporin and ciprofloxacin resistance in *Salmonella*, Taiwan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 947-950, 2005.

YANG, B.; QU, D.; ZHANG, X.; SHEN, J.; CUI, S.; SHI, Y.; XI, M.; SHENG, M.; ZHI, S.; MENG, J. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 63-72, 2010.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J. W.; STEWARD, C. D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F. C. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001.

YONG, D.; LIM, Y. S.; YUM, J. H.; LEE, H.; LEE, K.; KIM, E. C.; LEE, B. K.; CHONG, Y. Nosocomial outbreak of pediatric gastroenteritis caused by CTX-M-14-type extended-spectrum β -lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serovar London. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 3519-3521, 2005.

ZHAO, S.; FEDORKA-CRAY, P. J.; FRIEDMAN, S.; MCDERMOTT, P. F.; WALKER, R. D.; QAIYUMI, S.; FOLEY, S. L.; HUBERT, S. K.; AYERS, S.; ENGLISH, L.; DARGATZ, D. A.; SALAMONE, B.; WHITE, D. G. Characterization of *Salmonella* Typhimurium of animal origin obtained from the National Antimicrobial Resistance Monitoring System. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, n. 2, p. 169-181. 2005.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 02/07/2012

Tiago Casella