QUÉZIA MOURA DA SILVA

RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIMICROBIANOS EM UMA COMUNIDADE REMOTA DA FLORESTA AMAZÔNICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

Quézia Moura da Silva

Resistência bacteriana a antimicrobianos em uma comunidade remota da Floresta Amazônica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Nilton Lincopan

Versão original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço
de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Moura da Silva, Quézia
Resistência bacteriana a antimicrobianos em uma comunidade remota da Floresta Amazônica / Quézia Moura da Silva; orientador Nilton Erbet Lincopan Huenuman. -- São Paulo, 2017.
106 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Resistência antimicrobiana. 2. ESBL. 3. MLST. 4. Plasmídeos. 5. Comunidade remota. I. Erbet Lincopan Huenuman, Nilton, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Quézia Moura da Silva

Título da Tese: Resistência bacteriana a antimicrobianos em uma comunidade remota da Floresta Amazônica

Orientador(a): Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **697/14** referente ao projeto intitulado: "*Resistência bacteriana em uma comunidade remota da floresta Amazônica*" sob a responsabilidade de **Quézia Moura da Silva,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 11 de novembro de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico esta tese a meus pais, Maria Elena e Isaias, pelo amor e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela saúde e por me guiar e proteger durante essa jornada.

Aos meus pais, pelo amor, compreensão, apoio e pelos valores a mim transmitidos.

Ao meu orientador, professor Nilton Lincopan, pela oportunidade, pela confiança e pelo conhecimento compartilhado.

Ao Marco Vianello, pelo fornecimento das amostras utilizadas neste trabalho.

À Milena Dropa, pela ajuda inestimável ao longo da execução deste trabalho.

À professora Rosa Maria, pelo compartilhamento e ajuda com as técnicas de análise plasmidial.

Ao professor Jorge Sampaio e ao grupo Fleury, pela disponibilização de uso do aparelho de MALDI-TOF, e ao Edmir, por intermediar este processo.

Ao Daniel, pela disponibilização de uso do programa BioNumerics.

Ao Tiago, pela ajuda no preparo de bibliotecas para o sequenciamento de genoma completo.

À Louise, pelas montagens dos genomas e pela ajuda nas análises de bioinformática.

Aos professores Jorge Timenetsky, Rodrigo Galhardo e Doroti Garcia, pela avaliação deste trabalho e pelos valiosos comentários que muito acrescentaram para o melhoramento deste trabalho.

À Gisele, secretária da pós-graduação, que sempre esteve pronta a tirar dúvidas e ajudar no que fosse possível.

À Miriam, pela parceria no trabalho, pelos momentos de trocas de ideias, e pela amizade e companheirismo.

À Luana, que não mediu esforços para me ajudar na etapa final deste trabalho, e que me presenteou com a sua amizade ao longo desses quatro anos.

Às queridas amigas Tati, Lívia e Luciana por todos os momentos compartilhados dentro e fora do laboratório.

Aos demais colegas de laboratório, Lucianne, Helena, Maria, Fernanda, Ralf, Fábio e Marcelo, pelo companheirismo.

A todos os demais amigos que conheci em São Paulo, que sempre estiveram me apoiando, ajudando nos momentos mais difíceis, compartilhando os bons momentos e torcendo por mim.

Muito obrigada a todos!!!

AGRADECIMENTOS ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida [números de processo 1201925(03/2013 a 05/2014) e 1406338 (06/2014 a 02/2017).

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo projeto aprovado pela chamada MCTI/CNPq/Universal 14/2014 (número de processo 462042/2014-6), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos projetos financiados (números de processo 2013/04725-0 e 2016/08593-9), que proveram recursos necessários à execução deste trabalho.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

RESUMO

SILVA, Q. M. **Resistência bacteriana a antimicrobianos em uma comunidade remota da Floresta Amazônica.** 2017. 107 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O aparecimento e a disseminação de bactérias multi-resistentes estão estreitamente relacionados ao uso excessivo e inadequado de antimicrobianos em medicina humana/veterinária e na produção animal. Entretanto, alguns estudos têm relatado a presença dessas bactérias em comunidades remotas com baixa ou mínima exposição a antimicrobianos. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de bactérias produtoras de β-lactamases adquiridas, mediadas por plasmídeos, na microbiota Gram-negativa comensal de humanos e animais domésticos de diferentes etnias indígenas na região da Floresta Amazônica, e elucidar o seu contexto genético. No mês de março de 2013 foram coletadas amostras de fezes de indivíduos atendidos (*n* = 36) e funcionários (*n* = 9) de um centro assistencial em saúde restrito a comunidades indígenas. Adicionalmente, no mês de julho, foram coletadas amostras de "swab" retal de animais de companhia (*n* = 20) da comunidade. A identificação das espécies bacterianas foi feita por MALDI-TOF e a avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada pela técnica de Kirby-Bauer. A detecção de genes de resistência e a determinação de filogrupos de *E. coli* foi feita por PCR. A genotipagem dos isolados foi feita por ERIC-PCR e MLST. As avaliações de transferibilidade, tamanho e grupos de incompatibilidade plasmidial (Inc) foram realizadas por conjugação e transformação, S1-PFGE e PBRT, respectivamente. Isolados representativos de cada grupo clonal tiveram o genoma completo sequenciado. Surpreendentemente, foram identificados 30 isolados de origem humana e cinco de origem animal apresentando resistência a cefalosporinas e fluoroquinolonas. A presença dos genes $bla_{\text{TEM-1}}$ (78,6%) > $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (71,4%) > $bla_{\text{CTX-M-14}}$ (21,4%) > $bla_{\text{CTX-M-8}}$ e $bla_{\text{GES-5}}$ (7,1% cada) foi confirmada em 14 isolados (provenientes de 10 indivíduos), sendo a maioria identificada como *E. coli* (70%). Adicionalmente, a presença dos genes $bla_{\text{CTX-M-14}}$ (60%) > $bla_{\text{TEM-1}}$ (40%) > $bla_{\text{CTX-M-2}}$ e $bla_{\text{CTX-M-8}}$ (20% cada) foi confirmada em cinco cepas de *E. coli* isoladas de cães. O filogrupo D de *E. coli* foi predominantemente encontrado, tanto em isolados de humanos (*n* = 6) quanto de animais (*n* = 4). Foi observada relação clonal entre cinco isolados de *E. coli* de humanos e três de animais, e todos os isolados de *K. pneumoniae* foram representados por um único clone. A transferibilidade plasmidial foi observada em nove isolados carregando os genes bla_{TEM}, $bla_{\text{CTX-M-15}}$, $bla_{\text{CTX-M-14}}$ e $bla_{\text{CTX-M-8}}$. O Inc mais encontrado foi IncF (*n* = 11), classificado em seis replicons diferentes; seguido por IncI1 (*n* = 5), classificado no ST80 e ST131; e IncL/M (*n* = 1), em plasmídeos variando de 97-291 kb. O sequenciamento de genoma completo permitiu a detecção de outros genes de resistência a β-lactâmicos e a outras classes de antimicrobianos, bem como diversos genes de virulência. A presença de genes codificadores de ESBL e carbapenemase na microbiota comensal de indivíduos de uma comunidade remota no Brasil é um resultado inédito que demonstra que a disseminação de um problema endêmico em áreas urbanas para uma comunidade – em teoria – com baixa exposição a antibacterianos está acontecendo, sendo que as fontes e/ou veículos de aquisição são dignas de investigação, para um controle epidemiológico.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana. *Enterobacteriaceae*. ESBL. CTX-M. GES-5. MLST. Plasmídeos. Sequenciamento de genoma completo. Comunidade remota.

ABSTRACT

SILVA, Q. M. **Antimicrobial resistance in a remote community in the Amazon Forest.** 2017. 107 p. Ph.D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Emergence and spread of multiresistant bacteria are closely related to antimicrobial misuse in human and veterinary medicine and livestock. However, some studies have reported the presence of these bacteria in remote communities with low or minimal exposure to antimicrobials. Thus, the aim of this study was to investigate the presence of plasmid-mediated β-lactamase in the commensal Gram-negative microbiota of humans and domestic animals of different indigenous ethnic groups in the Amazon Forest region, and to elucidate their genetic context. In March 2013, stool samples were collected from individuals attended in a health care center restricted to indigenous communities (*n* = 36) and from their local staff (*n* = 9). Additionally, in July 2013, rectal swab samples were collected from companion animals (*n* = 20) in the community. Bacterial species identification was performed by MALDI-TOF and antimicrobial susceptibility was assessed by the Kirby-Bauer technique. Antimicrobial resistance genes and *E. coli* phylo-groups were detected by PCR. Clonal relation among the isolates was investigated by ERIC-PCR and MLST. Plasmid mobility, size, and incompatibility groups (Inc) were evaluated by conjugation and transformation, S1-PFGE, and PBRT, respectively. Representative isolates of each clonal group were submitted to whole genome sequencing. Surprisingly, 30 isolates from humans and five isolates from animals have presented resistance to cephalosporins and fluoroquinolones. The presence of $bla_{\text{TEM-1}}$ (78.6%) > $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (71.4%) > $bla_{\text{CTX-M-14}}$ (21.4%) > $bla_{\text{CTX-M-8}}$, and $bla_{\text{GES-5}}$ (1% each) genes was confirmed in 14 isolates (from 10 individuals), most of them identified as *E. coli* (70%). In addition, the presence of $bla_{\text{CTX-M-14}}$ (60%) > $bla_{\text{TEM-1}}$ (40%) > $bla_{\text{CTX-M-2}}$, and $bla_{\text{CTX-M-8}}$ (20% each) genes was confirmed in five *E. coli* strains isolated from dogs. *E. coli* phylo-group D was predominantly found in both human (*n* = 6) and animal (*n* = 4) isolates. A clonal relationship was observed among five *E. coli* isolates from humans and three from animals, and all *K. pneumoniae* isolates were represented by a single clone. Plasmid mobility was observed in nine isolates harboring $bla_{\text{TEM-1}}$, $bla_{\text{CTX-M-15}}$, $bla_{\text{CTX-M-14}}$, and $bla_{\text{CTX-M-8}}$ genes. IncF was the most prevalent Inc group (*n* = 11), classified in six different replicons; followed by IncI1 (*n* = 5), assigned to ST80 and ST131; and IncL/M (*n* = 1), in plasmids ranging from 97-291 kb. The whole genome sequencing allows the identification of other β-lactam resistance genes and genes conferring resistance to other antimicrobial classes, as well as several virulence genes. The presence of genes encoding ESBL and carbapenemase in the commensal microbiota of individuals from a remote community in Brazil is an unprecedented result. It demonstrates that the dissemination of an urban endemic problem to a community – in theory – with low antimicrobial exposure is occurring. Therefore, the sources and/or vehicles of acquisition are worthy of investigation in order to establish epidemiologic control measures.

Keywords: Antimicrobial resistance. *Enterobacteriaceae*. ESBL. CTX-M. GES-5. MLST. Plasmids. Whole genome sequencing. Remote community.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos β-lactâmicos 24
Figura 2 - Mapa de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas 40
Figura 3 - Mapa de distribuição das etnias indígenas no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas 42
Figura 4 - Representação esquemática da determinação dos filogrupos de *E. coli* 48
Figura 5 - Relação clonal dos isolados de *E. coli* de origem humana e animal, pela técnica de ERIC-PCR 66
Figura 6 - Relação clonal dos isolados de *K. pneumoniae*, pela técnica de ERIC-PCR 66
Figura 7 - Mapa das principais rotas de migração de aves nas Américas 83
Figura 8 - Mapa das principais rotas de aves migratórias no Brasil 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos antimicrobianos β-lactâmicos 22
Tabela 2 - Classificação das β-lactamases 27
Tabela 3 - Iniciadores específicos para genes de resistência codificadores de ESBL 47
Tabela 4 - Iniciadores utilizados para determinação dos filogrupos de *E. coli* 47
Tabela 5 - Iniciadores utilizados para genotipagem de *E. coli* por MLST 49
Tabela 6 - Iniciadores utilizados para genotipagem de *K. pneumoniae* por MLST 50
Tabela 7 - Iniciadores utilizados para genotipagem de *E. asburiae* e *E. kobei* (complexo *E. cloacae*) por MLST 50
Tabela 8 - Iniciadores utilizados para identificação dos grupos de incompatibilidade plasmidial 56
Tabela 9 - Caracterização epidemiológica e fenotípica dos isolados resistentes de indivíduos atendidos e da equipe técnica da CASAI 60
Tabela 10 - Caracterização epidemiológica e fenotípica dos isolados resistentes de origem animal 62
Tabela 11 - Percentual de resistência aos antimicrobianos dos isolados de origem humana e animal, avaliado pela técnica de Kirby-Bauer 63
Tabela 12 - Caracterização genotípica dos isolados de origem humana quanto aos genes de resistência, os filogrupos de *E. coli* e o padrão clonal 64
Tabela 13 - Caracterização genotípica dos isolados de origem animal quanto aos genes de resistência, os filogrupos de *E. coli* e o padrão clonal 65
Tabela 14 - Caracterização dos plasmídeos dos isolados de origem humana e animal quanto à mobilização, aos grupos de incompatibilidade e ao tamanho plasmidial 68
Tabela 15 - Caracterização genotípica de isolados representativos de diferentes grupos clonais, pela técnica de sequenciamento de genoma completo 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Ácido Clavulânico

AMC – Amoxacilina/Ácido Clavulânico

AMI – Amicacina

BHI – Brain Heart Infusion

BLAST – Basic Local Alignment Tool

CA – Califórnia

$CaCl_2$ – Cloreto de Cálcio

CASAI – Casa de Apoio à Saúde Indígena

CAZ – Ceftazidima

CC – Complexo Clonal

CEFAP – Centro de Facilidade para a Pesquisa

CEGH-CEL – Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco

CFO – Cefoxitina

CIP – Ciprofloxacina

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CPM – Cefepima

CREAM – Centro de Referência Especializada Ambulatorial

CRO – Ceftriaxona

CTX – Cefotaxima

DO – Densidade Óptica

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EAEC – *Escherichia coli* Enteroagregativa

EPEC – *Escherichia coli* Enteropatogênica

ExPEC – *Escherichia coli* Extraintestinal

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

EST – Estreptomicina

ETP – Ertapenem

EUCAST – European Commitee on Antimicrobial Susceptibility Testing

ERIC-PCR – Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence-PCR

ESBL – Beta-Lactamase de Espectro Estendido

FOS - Fosfomicina

GEN – Gentamicina

GENIAL – Genome Investigation and Analysis Laboratory

HGuSGC – Hospital de Guarnição de São Gabriel da Cachoeira

IPM – Imipenem

KCl – Cloreto de Potássio

LB – Luria Bertani

MALDI-TOF – Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight

$MgCl_2$ – Cloreto de Magnésio

MLST – Multilocus Sequence Typing

NAL – Ácido Nalidíxico

NaOH – Hidróxido de Sódio

PBRT – PCR-Based Replicon Typing

PCR – Polymerase Chain Reaction

PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis

pMLST – Plasmid Multilocus Sequence Typing

RPM – Rotações por Minuto

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

ST – Sequence Type

SUT – Sulfametoxazol/Trimetoprim

TBE – Tris-Borato-EDTA

TE – Tris-EDTA

TET – Tetraciclina

TIG – Tigeciclina

TOB – Tobramicina

TSA – Ágar Triptona de Soja

TSB – Caldo Triptona de Soja

TZB – Tazobactam

UK – United Kingdom

UPGMA – Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages

USA – United States of America

LISTA DE SÍMBOLOS

β – Beta

°C – Graus Celsius

kb - Quilobase

Km – Quilômetro

kV – Kilovolt

M – Molar

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mM – Milimolar

mm – Milímetro

N – Normal

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

pb – Pares de bases

U – Unidade

µg – Micrograma

V – Volts

% – Porcentagem

≈ – Aproximadamente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
2 REVISÃO DE LITERATURA 21
2.1 Antimicrobianos β-lactâmicos 21
2.1.1 Penicilinas 21
2.1.2 Cefalosporinas 24
2.1.3 Carbapenêmicos 25
2.1.4 Monobactâmicos 25
2.1.5 Inibidores de β-lactamases 26
2.2 Produção de β-lactamases 26
2.2.1 β-lactamases de espectro reduzido 27
2.2.1.1 Famílias TEM e SHV 27
2.2.1.2 Família OXA 28
2.2.2 β-lactamases de espectro estendido (ESBLs) 29
2.2.3 AmpC 32
2.2.4 GES-5 33
2.3 Plasmídeos e a disseminação de genes codificadores de ESBLs 34
2.4 β-lactamases em comunidades remotas 35
2 OBJETIVOS 39
2.1 Objetivo geral 39
2.2 Objetivos específicos 39
3 MATERIAIS E MÉTODOS 40
3.1 População de estudo 40
3.2 Amostras biológicas 42
3.3 Triagem e isolamento das bactérias Gram-negativas resistentes 43
3.4 Teste de susceptibilidade antimicrobiana e caracterização fenotípica de ESBL e AmpC 43
3.5 Identificação das espécies bacterianas 44
3.6 Extração de DNA genômico para reação em cadeia da polimerase (PCR) 45
3.7 Identificação dos genes codificadores de ESBL pela técnica de PCR 46
3.8 Determinação dos filogrupos de *E. coli* 47
3.9 Genotipagem dos isolados por ERIC-PCR 48
3.10 Genotipagem por tipagem de sequências de multilocus (MLST) 49

3.11 Extração de DNA plasmidial 51
3.12 Mobilização dos genes de resistência 52
3.12.1 Conjugação 52
3.12.2 Preparo de células eletrocompetentes e transformação por eletroporação 53
3.12.3 Preparo de células termocompetentes e transformação por choque térmico 53
3.13 Análise de tamanho plasmidial 54
3.13.1 Preparo dos *plugs* 54
3.13.2 S1-PFGE 55
3.14 Análise dos grupos de incompatibilidade plasmidial 55
3.15 Sequenciamento de genoma completo 57
4 RESULTADOS 59
5 DISCUSSÃO 74
6 CONCLUSÕES 87
REFERÊNCIAS 88

1 INTRODUÇÃO

Infecções causadas por bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos são um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Essas bactérias estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade e, também, a elevados custos hospitalares. O surgimento e a dispersão das mesmas estão estreitamente relacionados ao uso excessivo e inadequado de antimicrobianos nas práticas médica e veterinária e na produção animal (LYE et al., 2012; SCHWABER et al., 2006).

Contudo, os antimicrobianos não agem apenas sobre bactérias patogênicas, mas também sobre bactérias comensais, principalmente da microbiota intestinal. A pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos pode causar um significativo impacto na microbiota intestinal, promovendo o desenvolvimento de bactérias multi-resistentes, bem como diminuindo a resistência à colonização por outras bactérias e propiciando a transferência horizontal de genes de resistência (MACFARLANE, 2014).

O intestino de humanos e animais é o principal reservatório de bactérias multi-resistentes. Essas bactérias podem permanecer nele de forma assintomática, por longos períodos de tempo, e serem disseminadas no ambiente ou entre humanos e animais, por transmissão cruzada, sendo este um fator preponderante na ocorrência de infecções comunitárias (CARLET, 2012; WOERTHER et al., 2013a).

As bactérias gram-negativas, especialmente enterobactérias e não-fermentadoras, são as mais relacionadas à resistência antimicrobiana devido à diversidade de mecanismos de resistência que apresentam e à facilidade de disseminação de seus genes através de elementos genéticos móveis, como plasmídeos. A produção de β-lactamases é o principal mecanismo de resistência utilizado por essas bactérias (EL SALABI; WALSH; CHOUCHANI, 2013).

Apesar de terem sua ocorrência na comunidade associada à pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos (DIAS et al., 2012; LEISTNER et al., 2013; RAJAPANDIYAN et al., 2014; WOERTHER et al., 2013a; WOLLHEIM et al., 2011), alguns estudos têm relatado a presença de bactérias produtoras de β-lactamases em comunidades remotas com baixa ou mínima exposição a antimicrobianos (BARTOLONI et al., 2004, 2009; PALLECCHI et al., 2007; WOERTHER et al., 2010, 2013b)

Os mecanismos pelos quais essas bactérias apresentam esse fenótipo de resistência, independentemente da pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos, ainda não estão bem elucidados. Portanto, a pesquisa de bactérias multi-resistentes e a compreensão dos mecanismos pelos quais elas se estabelecem em comunidades remotas, são fundamentais para

o estabelecimento de medidas de controle da disseminação da resistência nessas comunidades e, também, para traçar estratégias de prevenção do surgimento da resistência em outras comunidades em condições semelhantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Antimicrobianos β-lactâmicos

Desde a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, os β-lactâmicos têm sido as drogas mais utilizadas no tratamento de infecções bacterianas, especialmente por apresentarem amplo espectro de ação, atividade bactericida e uma grande margem de segurança (HUBSCHWERLEN, 2007; KOTRA; MOBASHERY, 1999). Estas drogas são quimicamente caracterizadas pela presença de um anel β-lactâmico, que se liga covalentemente a proteínas ligadoras de penicilina (PBPs – do inglês, *penicillin-binding proteins*), modificando sua estrutura e impedindo sua função. As PBPs atuam na síntese da parede celular bacteriana, promovendo a ligação cruzada das cadeias de peptideoglicano. Portanto, ao impedir a ação das PBPs, os β-lactâmicos impedem a formação da parede celular, causando a lise bacteriana (KONG; SCHNEPER; MATHEE, 2010; KOTRA; MOBASHERY, 1999).

Apesar de compartilharem uma estrutura e um mecanismo de ação em comum, os β-lactâmicos são divididos em diferentes grupos de acordo com seus diferentes espectros de ação e estruturas químicas adicionais. Estes diferentes grupos são classificados como penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos e inibidores de β-lactamases (MARTIN; KAYE, 2004; SUÁREZ; GUDIOL, 2009), como apresentado na tabela 1. As pequenas diferenças de estrutura química dentro de cada grupo são responsáveis por modificar o espectro de ação do antimicrobiano, a afinidade por determinados receptores ou a resistência a β-lactamases (SUÁREZ; GUDIOL, 2009), como mostrado na figura 1.

2.1.1 Penicilinas

As penicilinas são divididas em benzilpenicilinas (ou penicilinas naturais), penicilinas resistentes às penicilinases, aminopenicilinas e penicilinas de amplo espectro. O uso clínico das penicilinas teve início com a penicilina G (benzilpenicilina), principalmente para o tratamento de infecções por estreptococos. Com o surgimento de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes à penicilina G, foram produzidas derivadas semi-sintéticas resistentes às penicilinases, das quais destacam-se a meticilina e a oxacilina (BUSH; BRADFORD, 2016). De modo a estender a atividade das penicilinas às bactérias Gram-negativas, foram introduzidas as aminopenicilinas (ativas contra enterobactérias) e as ureído-penicilinas e

Tabela 1 - Classificação dos antimicrobianos β-lactâmicos (continua)

Grupo	**Espectro de ação**	**Antimicrobiano**
Penicilinas		
Benzilpenicilinas ou penicilinas naturais	Reduzido	Penicilina cristalina aquosa, penicilina G procaína, penicilina G benzatina e penicilina V
Aminopenicilinas	Gram-positivas e enterobactérias	Amoxicilina e ampicilina
Penicilinas resistentes às penicilinases	Gram-positivas	Oxacilina, meticilina, cloxacilina, nafcilina e dicloxacilina
Penicilinas de amplo espectro	Estafilococos, anaeróbios, enterobactérias e *Pseudomonas* spp.	Ureído-penicilinas: piperacilina, azlocilina, mezlocilina Carboxipenicilinas: cabernicilina e ticarcilina
Combinadas com inibidores de β-lactamases	*S. aureus*, enterobactérias, anaeróbios produtores de β-lactamases, *H. influenzae* e *Moraxella catarrhalis* produtoras de β-lactamases.	Amoxicilina/ácido clavulânico
	E. coli, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa*, *Serratia* spp., *Providencia* spp., *S. aureus* oxacilina sensível e *Bacteroides fragilis*.	Ticarcilina/ácido clavulânico
	Cepas produtoras de β-lactamases, incluindo *S. aureus*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *E. coli*, *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Klebsiella* spp. e anaeróbios; inativo contra *P. aeruginosa* ou cepas de enterobactérias indutoras de β-lactamases.	Ampicilina/sulbactam
	S. aureus oxacilina sensível, estreptococos, enterococos, enterobactérias produtoras de β-lactamases, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* e *M. catarrhalis*.	Piperacilina/tazobactam

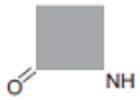
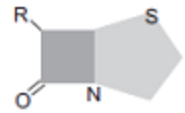
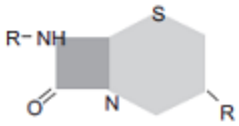
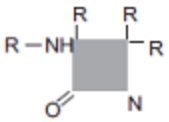
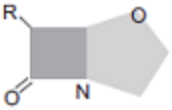
Fonte: Adaptada de Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2007; Suárez; Gudiol, 2009.

Tabela 1 - Classificação dos antimicrobianos β-lactâmicos (continuação)

Grupo	**Espectro de ação**	**Antimicrobiano**
Cefalosporinas		
Primeira geração	Gram-positivas; atividade moderada contra *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *K. pneumoniae* adquiridos na comunidade	Cefalotina, cefazolina, cefalexina e cefadroxila
Segunda geração	*H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*; aumento da atividade "*in vitro*" contra algumas enterobactérias	Cefoxitina (cefamicina), cefuroxima e cefaclor
Terceira geração	*S. pneumoniae*, *S. pyogenes* e outros estreptococos; Gram-negativas facultativas; atividade moderada contra os *S. aureus* sensível à oxacilina (com exceção da ceftazidima); atividade contra *P. aeruginosa* (somente a ceftazidima)	Cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima
Quarta geração	Gram-positivas, gram-negativas, incluindo *Pseudomonas* spp.; resistência a β-lactamases e pouco indução da sua produção	Cefepima
Monobactâmicos	Enterobactérias	Aztreonam
Carbapenêmicos	Amplo espectro de ação para uso em infecções sistêmicas; estáveis à maioria das β-lactamases. Meropenem é mais ativo contra Gram-negativas, enquanto imipenem apresenta atividade um pouco superior contra Gram-positivas. Ertapenem não tem atividade contra *P. aeruginosa* e *A. baumannii*.	Meropenem, imipenem e ertapenem

Fonte: Adaptada de Anvisa, 2007; Suárez; Gudiol, 2009.

Figura 1 - Estrutura química dos β-lactâmicos

 Anel β-lactâmico + Anel secundário = Núcleo do β-lactâmico → Grupo antimicrobiano			
	Anel tiazolidínico	Ácido 6-aminopenicilânico	PENICILINAS
	Anel dihidrotiacínico	Ácido 7 α-cefalosporínico	CEFALOSPORINAS
	Anel pirrolínico	Carbapenêmico	CARBAPENÊMICOS
	Nenhum	Monobactâmico	MONOBACTÂMICOS
	Anel oxazolidínico	Clavâmico	ÁCIDO CLAVULÂNICO*
*Todos os inibidores de β-lactamase utilizados na prática (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) possuem estrutura β-lactâmica.			

Fonte: Adaptada de Suárez; Gudiol, 2009.

carboxipenicilinas (com ação adicional contra *Pseudomonas* spp.) (SUÁREZ; GUDIOL, 2009). Entretanto, devido ao surgimento de β-lactamases, estas drogas são têm sido pouco utilizadas como monoterapia, principalmente contra bactérias Gram-negativas (BUSH; BRADFORD, 2016).

2.1.2 Cefalosporinas

Em geral, as cefalosporinas são classificadas em primeira-, segunda-, terceira-, quarta- e quinta-geração, de acordo com sua atividade antibacteriana. As cefalosporinas de primeira-geração apresentam boa atividade contra cocos Gram-positivos (com exceção de enterococos e estafilococos meticilina-resistentes) e anaeróbios (com exceção de *Bacteroides fragilis*), e atividade moderada contra enterobactérias. As cefalosporinas de segunda-geração diferenciam-se das cefalosporinas de primeira-geração por apresentar maior atividade contra enterobactérias, como *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. As cefalosporinas de terceira-geração têm atividade limitada contra cocos Gram-positivos, enquanto apresentam um amplo espectro de ação contra bacilos Gram-negativos. A ceftazidima, em particular, é utilizada com sucesso no tratamento de infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. As cefalosporinas de

quarta-geração apresentam maior atividade contra espécies de *Enterobacter* e *Citrobacter* que são resistentes às cefalosporinas de terceira-geração (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013). As cefalosporinas de quinta-geração foram introduzidas recentemente e são representadas pela ceftarolina e pela ceftolozane. A ceftarolina apresenta um espectro de ação estendido contra Gram-positivos, incluindo *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* vancomicina-resistentes (VRSA – do inglês, *vancomicin-resistant Staphylococcus aureus*) e *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes (MRSA – do inglês, *meticillin-resistant Staphylococcus aureus*), e contra Gram-negativos como *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* (BASSETTI et al., 2013). A ceftolozane, por sua vez, é utilizada em combinação com o tazobactam para o tratamento de infecções graves por Gram-negativos, especialmente por *P. aeruginosa* (BASSETTI et al., 2013; SUCHER et al., 2015).

2.1.3 Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos apresentam um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo enterobactérias produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBL – do inglês, *extended-spectrum* β-*lactamase*), o que os torna uma importante opção para tratamento de infecções graves (BREILH et al., 2013; PAPP-WALLACE et al., 2011). Atualmente, os carbapenêmicos são representados por ertapenem, imipenem, meropenem e doripenem. O imipenem possui eficácia contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, não-fermentadores e anaeróbios. O meropenem é mais potente que o imipenem contra enterobactérias; entretanto, possui atividade antimicrobiana bem menor contra bactérias Gram-positivas. O doripenem apresenta potencial antimicrobiano semelhante ao do meropenem, exceto pelo fato de ser mais potente contra bactérias Gram-negativas. O ertapenem, por sua vez, difere dos outros carbapenêmicos por não possuir atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (BREILH et al., 2013; BUSH; BRADFORD, 2016).

2.1.4 Monobactâmicos

Os monobactâmicos apresentam atividade contra bactérias Gram-negativas, contudo são suscetíveis às ESLBs das enterobactérias e não são completamente ativos contra *P. aeruginosa*. Esses antimicrobianos não possuem atividade contra bactérias Gram-positivas e

anaeróbias. Atualmente, o único monobactâmico disponível para uso clínico é o aztreonam (HUBSCHWERLEN, 2007; SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

2.1.5 Inibidores de β-lactamases

Os inibidores de β-lactamases são caracterizados por possuir uma alta afinidade por essas enzimas, unindo-se a elas de forma irreversível e, assim, permitindo a ação do antimicrobiano sobre a bactéria (SUÁREZ; GUDIOL, 2009). Atualmente, os inibidores de β-lactamases utilizados na prática clínica são ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. O ácido clavulânico apresenta espectro de inibição contra penicilinases, ESBLs e, em menor extensão, contra carbapenemases, sendo utilizado em combinação com penicilinas e cefalosporinas no tratamento de infecções causadas por enterobactérias. Em casos de infecções causadas por *P. aeruginosa*, este inibidor é combinado com ticarcilina. Sulbactam e tazobactam apresentam um espectro de atividade similar ao do ácido clavulânico, com atividade superior contra cefalosporinases. Por outro lado, o sulbactam possui menos atividade contra penicilinases. O sulbactam é utilizado em combinação com ampicilina, para uso geral, e em combinação com cefoperazona em tratamentos contra bactérias não-fermentadoras e anaeróbias. O tazobactam, por sua vez, é comumente utilizado em combinação com piperacilina e, em casos de infecções por *P. aeruginosa*, é combinado com cefoperazona (cefalosporina de terceira-geração) e ceftolozane (cefalosporina de quinta-geração) (BUSH; BRADFORD, 2016).

2.2 Produção de β-lactamases

A produção de β-lactamases é o mecanismo de resistência mais comum contra antimicrobianos β-lactâmicos, em bactérias Gram-negativas (BONOMO, 2017). Estas enzimas inativam o antimicrobiano através da hidrólise do anel β-lactâmico (ABRAHAM; CHAIN, 1940). As β-lactamases podem ser classificadas molecularmente, com base na sequência de aminoácidos (AMBLER et al., 1991), ou funcionalmente, com base nos perfis dos inibidores e dos substratos, correlacionando-as com o fenótipo apresentado nos isolados (BUSH; JACOBY, 2010), como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2 - Classificação das β-lactamases

Ambler	Bush-Jacoby	Substrato	Inibidor		Enzimas representativas
			AC ou TZB*	EDTA	
C	1	Cefalosporinas	Não	Não	*E. coli* AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
	1e	Cefalosporinas	Não	Não	GC1, CMY-37
A	2a	Penicilinas	Sim	Não	PC1
	2b	Penicilinas, cefalosporinas de espectro restrito	Sim	Não	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Cefalosporinas de espectro estendido, monobactâmicos	Sim	Não	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
	2br	Penicilinas	Não	Não	TEM-30, SHV-10
	2ber	Cefalosporinas de espectro estendido, monobactâmicos	Não	Não	TEM-50
	2c	Carbenicilina	Sim	Não	PSE-1, CARB-3
	2ce	Carbenicilina, cefepima	Sim	Não	RTG-4
D	2d	Cloxacilina	Variável	Não	OXA-1, OXA-10
	2de	Cefalosporinas de espectro estendido	Variável	Não	OXA-11, OXA-15
	2df	Carbapenêmicos	Variável	Não	OXA-23, OXA-48
A	2e	Cefalosporinas de espectro estendido	Sim	Não	CepA
	2f	Carbapenêmicos	Variável	Não	KPC-2, IMI-1, SME-1
B (B1, B3)	3a	Carbapenêmicos	Não	Sim	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
B (B2)	3b	Carbapenêmicos	Não	Sim	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1, CphA, Sfh-1

*AC, ácido clavulânico; TZB, tazobactam.
Fonte: Adaptada de Bush; Jacoby, 2010.

2.2.1 β-lactamases de espectro reduzido

2.2.1.1 Famílias TEM e SHV

As β-lactamases de espectro reduzido das famílias TEM e SHV são enzimas capazes de hidrolisar penicilina e cefalosporinas de espectro restrito, como cefaloridina e cefalotina, e são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. Estas enzimas estão classificadas no grupo 2b, de Bush-Jacoby, e na classe A, de Ambler. Elas são representadas, principalmente, pelas enzimas TEM-1, TEM-2, TEM-13 e SHV-1, codificadas por plasmídeos (BUSH; JACOBY,

2010; PATERSON; BONOMO, 2005). A enzima TEM-1 é a β-lactamase mediada por plasmídeos mais encontrada em enterobactérias resistentes a ampicilina (GUTKIND et al., 2013; PATERSON; BONOMO, 2005). Esta enzima foi descrita pela primeira vez em 1965, em uma cepa de *E. coli* isolada de uma paciente em Atenas, na Grécia, chamada Temoneira (por isso a nomenclatura TEM) (DATTA; KONTOMICHALOU, 1965).

Já a enzima SHV-1 foi inicialmente descrita em *K. pneumoniae* e é cromossalmente codificada pela vasta maioria das cepas desta espécie (BABINI; LIVERMORE, 2000; LIVERMORE, 1995). Entretanto, a localização plasmidial desta enzima também já foi constatada em cepas de *K. pneumoniae* e em outras enterobactérias (BARTHELEMY; PEDUZZI; LABIA, 1988; MATTHEW; HEDGES; SMITH, 1979; NUGENT; HEDGES, 1979). Apesar de apresentar um espectro de ação similar ao de TEM-1, TEM-2 e TEM-13, a SHV-1 se diferencia por possuir maior atividade hidrolítica contra ampicilina (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). Além disso, isolados com hiper-produção de SHV-1, mesmo sem produção de ESBLs ou AmpC, podem apresentar concentração inibitória mínima (CIM) para ceftazidima de até 32 μg/mL (MIRÓ et al., 1998) e/ou resistência a combinações de β-lactâmicos com inibidores de β-lactamases (RICE et al., 2000).

Desde a descoberta de TEM-1, TEM-2, TEM-13 e SHV-1, novas β-lactamases de espectro reduzido têm sido descritas, frequentemente durante a caracterização de outras β-lactamases (BUSH; JACOBY, 2010).

2.2.1.2 Família OXA

As β-lactamases de espectro reduzido da família OXA são enzimas codificadas por plasmídeos, capazes de hidrolisar oxacilina e cloxacilina, e são fracamente inibidas por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Estas enzimas estão classificadas no grupo 2d, de Bush-Jacoby, e na classe D, de Ambler, e têm como principal representante a enzima OXA-1 (BUSH; JACOBY, 2010; EVANS; AMYES, 2014; PATERSON; BONOMO, 2005). Uma característica peculiar da enzima OXA-1 é a sua capacidade de hidrolisar cefepima (cefalosporina de quarta-geração) e apresentar atividade limitada contra ceftazidima (cefalosporina de terceira-geração) (AUBERT et al., 2001; BOYLE et al., 2011; TORRES et al., 2016). Além disso, o gene $bla_{\text{OXA-1}}$ tem sido encontrado em cepas produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBLs), o que confere resistência a combinações de β-lactâmicos com inibidores de β-lactamases, dificultando o tratamento das infecções (KIIRU et al., 2012; MACHADO et al., 2006; POIREL et al., 2011).

2.2.2 β-lactamases de espectro estendido (ESBLs)

As ESBLs são enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de primeira-, segunda- e terceira-geração – e também de quarta geração, no caso das CTX-Ms –, e aztreonam, e podem ser inibidas por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Estas enzimas estão classificadas nos grupos 2be e 2de, de Bush-Jacoby, e nas classes A e D, de Ambler (BUSH; JACOBY, 2010; PATERSON; BONOMO, 2005). As principais enzimas representativas das ESBLs pertencem às famílias TEM, SHV e CTX-M e, geralmente, são codificadas por genes localizados em grandes plasmídeos (EL SALABI; WALSH; CHOUCHANI, 2013).

As ESBLs das famílias TEM e SHV são derivadas das enzimas TEM-1 e TEM-2, e SHV-1, respectivamente. Essas enzimas se originaram a partir de mutações de ponto na região do sítio ativo, como resposta à pressão seletiva exercida pelo uso de cefalosporinas de espectro estendido (PATERSON; BONOMO, 2005). A primeira descrição de uma enzima SHV com atividade de ESBL foi feita em 1983, na Alemanha, em um isolado de *Klebsiella ozaenae*. Essa enzima se diferenciava de sua precursora, SHV-1, por um único aminoácido e foi nomeada SHV-2 (KNOTHE et al., 1983). Já em 1987, foi descrita a primeira ESBL do tipo TEM, encontrada em um isolado de *Klebsiella pneumoniae*, na França. A enzima, denominada TEM-3, se diferenciava de sua precursora, TEM-2, por duas substituições de aminoácidos (SIROT et al., 1987; SOUGAKOFF et al., 1988).

Diferentemente das ESBLs das famílias TEM e SHV, as enzimas da família CTX-M parecem ter se originado a partir da mobilização de genes cromossomais de *Kluyvera* spp. (CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012; PATERSON; BONOMO, 2005; POIREL; KÄMPFER; NORDMANN, 2002). O primeiro relato de ESBL do tipo CTX-M foi feito em 1989, em um isolado clínico de *E. coli*, em Munique, Alemanha. A enzima conferia um fenótipo de resistência à cefotaxima e susceptibilidade à ceftazidima, sendo denominada CTX-M-1 (CTX como sigla para cefotaxima, M de Munique e 1 por ser a primeira) (BAUERNFEIND; SCHWEIGHART; GRIMM, 1990). Logo em seguida, em 1990, foi feita a primeira detecção de uma enzima CTX-M na América Latina – mais precisamente em Buenos Aires, Argentina – em isolados clínicos de *Salmonella* sorotipo Typhimurium. Por apresentarem um ponto isoelétrico diferente da enzima CTX-M-1, essas enzimas foram denominadas CTX-M-2 (BAUERNFEIND et al., 1992).

Apesar dos primeiros relatos de CTX-M terem ocorrido em 1989 e 1990, somente nos anos 2000 foi observada uma rápida evolução e dispersão destas enzimas (CANTÓN;

GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012). Atualmente, são conhecidas 172 variantes de CTX-M (LAHEY, 2016), as quais estão divididas em cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. Esta divisão é baseada nas similaridades das sequências de aminoácidos, onde enzimas pertencentes a um mesmo grupo compartilham >94% de identidade e enzimas pertencentes a grupos diferentes podem compartilhar ≤90% de identidade (BONNET, 2004).

As variantes de CTX-M estão mundialmente disseminadas e já superam o número de ocorrências de outros tipos de ESBLs, como TEM e SHV (D'ANDREA et al., 2013). A disseminação destas enzimas ultrapassou a barreira dos ambientes hospitalares e atingiu comunidade, animais de companhia, animais de produção, animais selvagens e ambiente (CONTE et al., 2017; EWERS et al., 2012; GUENTHER; EWERS; WIELER, 2011; MADEC et al., 2017; TACAO; CORREIA; HENRIQUES, 2012; TROTT, 2013). Apesar de serem reportadas em diversas espécies de bactérias Gram-negativas, as enzimas CTX-M estão presentes, principalmente, em cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* (WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011). Em todo o mundo, CTX-M-14 (grupo 9) e CTX-M-15 (grupo 1) são as variantes isoladas com mais frequência de humanos, animais e ambiente (LAHLAOUI; BEN HAJ KHALIFA; BEN MOUSSA, 2014).

Acredita-se que um dos principais fatores responsáveis pela dispersão global dessas enzimas seja a relação de clones específicos com variantes de CTX-M, uma vez que estudos utilizando a técnica de tipagem de sequências de multilocus (MLST – do inglês, *multilocus sequence typing*) têm reportado enzimas CTX-M frequentemente relacionadas a poucos tipos de sequência (STs), como, por exemplo, CTX-M-15 relacionada ao ST131 e CTX-M-14 relacionada ao ST38 de *E. coli* (DAMJANOVA et al., 2008; EWERS et al., 2014; MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015; NICOLAS-CHANOINE et al., 2008; WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011). Além disso, esses clones podem estar super-representados entre cepas não produtoras de ESBL, facilitando a aquisição de genes $bla_{\text{CTX-M}}$ associados (CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012).

Outro fator crucial para o processo de disseminação é a colonização do trato gastrointestinal por enterobactérias produtoras de CTX-M. As infecções causadas por bactérias produtoras de CTX-M, geralmente, são precedidas por colonização do trato gastrointestinal, que é considerado o principal reservatório desses patógenos. Uma vez colonizados, estes indivíduos são considerados um importante veículo de transmissão na comunidade e desempenham um papel fundamental na disseminação global, através das viagens internacionais (KARANIKA et al., 2016; WOERTHER et al., 2013a).

Adicionalmente, é muito comum que bactérias produtoras de CTX-M apresentem resistência concomitante a outras classes de antimicrobianos, favorecendo o processo de co-seleção e, assim, enriquecendo a microbiota intestinal com estas cepas (CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012). Os plasmídeos que carreiam os genes $bla_{\text{CTX-M}}$, frequentemente, carreiam genes de resistência a fluoroquinolonas, como *aac(6')-Ib-cr* e variantes de *qnr* e *oqx* (LIU et al., 2012, 2013; ZURFLUH et al., 2014). Os clones de alto-risco associados a enzimas CTX-M também têm maior propensão a adquirir genes resistência a aminoglicosídeos, sulfametoxazol/trimetoprim e fosfomicina (CAN et al., 2015; CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012; OTEO et al., 2009). Da mesma forma, as enzimas CTX-M podem estar associadas a outras β-lactamases, como oxacilinases e cefalosporinases (DORTET et al., 2012; SEIFFERT et al., 2014).

Na América Latina, as taxas de infecções hospitalares e comunitárias causadas por enterobactérias produtoras de ESBLs, especialmente CTX-M, têm aumentado desde o início dos anos 2000. Interessantemente, a produção de ESBLs por *E. coli* e *K. pneumoniae* é maior do que em outras regiões do mundo (GUZMÁN-BLANCO et al., 2014; SALLES et al., 2013; VILLEGAS et al., 2011). Dados coletados entre 2004 e 2010 mostram que a frequência de isolados de *E. coli* produtores de ESBLs foi maior no Chile, Equador, Guatemala, Honduras e México (FERNANDEZ-CANIGIA; DOWZICKY, 2012; GALES et al., 2012; HAWSER et al., 2012). Por outro lado, isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBLs foram mais frequentes na Argentina, Brasil, Chile e Honduras (FERNANDEZ-CANIGIA; DOWZICKY, 2012; GALES et al., 2012). Entretanto, apesar das ESBLs serem descritas principalmente em *Klebsiella* spp. e *E. coli*, elas também têm sido reportadas em outras enterobactérias, como *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Salmonella* spp. e *Enterobacter* spp. (BRADFORD, 2001; MINARINI et al., 2007).

As ESBLs do tipo SHV (particularmente SHV-5 e SHV-12) foram altamente prevalentes no México, Colômbia e Brasil, de acordo com dados publicados entre 2005 e 2013 (GUZMÁN-BLANCO et al., 2014). Em contrapartida, as enzimas CTX-M estão disseminadas na maioria dos países latino-americanos. Em um estudo realizado entre 2008 e 2012, com amostras de *K. pneumoniae* isoladas de infecção intra-abdominal de 11 países da América Latina (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, República Dominicana, Equador, Guatemala, México, Panamá, Porto Rico e Venezuela), CTX-M-15, CTX-M-2 e SHV-12 foram as ESBLs mais encontradas e amplamente disseminadas (KAZMIERCZAK et al., 2015).

Na Argentina, CTX-M-2 é uma variante endêmica e, a partir de 2010, notou-se o surgimento da variante CTX-M-15, associada a clones pandêmicos (ST131 de *E. coli* e ST11 de *K. pneumoniae*), e de variantes dos grupos CTX-M-8 e CTX-M-9 (SENNATI et al., 2012). Em estudos realizados no Chaco Boliviano, com *E. coli* comensais isoladas de crianças saudáveis no início dos anos 90, no início dos anos 2000 e em 2011, foi possível observar um drástico aumento (120 vezes desde o início dos anos 2000) na disseminação de enzimas CTX-M, durante esse período. Além disso, foi observada uma mudança de CTX-M-1 e CTX-M-9 como os grupos dominantes, para o grupo CTX-M-2 (BARTOLONI et al., 2013).

No Brasil, a primeira descrição de produção de ESBLs em enterobactérias foi feita em 1997, em isolados clínicos de *K. pneumoniae* em São Paulo e Rio de Janeiro (GALES et al., 1997). Ainda nesse mesmo ano, foram identificados isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de ESBLs em 18 hospitais de quatro diferentes estados brasileiros (SADER et al., 1997). No ano 2000 foi divulgado o primeiro estudo com caracterização molecular de ESBLs no Brasil. Foi identificada a variante CTX-M-2 e, pela primeira vez no mundo, a variante CTX-M-8, em enterobactérias de diferentes espécies, isoladas de diferentes hospitais no Rio de Janeiro (BONNET et al., 2000). Desde então, diferentes variantes de CTX-M têm sido detectadas tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade. Seguindo o padrão epidemiológico mundial e latino-americano, *E. coli* e *K. pneumoniae* são as espécies mais frequentemente associadas às enzimas CTX-M. As variantes CTX-M-2 e CTX-M-15 são as variantes mais detectadas, seguidas de CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-59, principalmente na região sudeste do país, que é a região com maior frequência de variantes de CTX-M (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016).

2.2.3 AmpC

As β-lactamases do tipo AmpC são enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de até terceira-geração, cefamicinas (como cefoxitina) e monobactâmicos, mas não são inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam. A hidrólise de cefalosporinas de quarta-geração e de carbapenêmicos também pode ser observada, mas em níveis muito baixos, em casos de superprodução da enzima. Essas enzimas estão classificadas no grupo 1, de Bush-Jacoby, e na classe C, de Ambler (BUSH; JACOBY, 2010; JACOBY, 2009).

As enzimas do tipo AmpC são amplamente distribuídas entre diversos gêneros bacterianos e podem ser mediadas por cromossomo ou plasmídeo. AmpCs mediadas por cromossomo têm sido descritas em *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Chromobacterium*

violaceum, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Hafnia alvei*, *Lysobacter lactamgenus*, *Morganella morganii*, *Ochrobactrum anthropi*, *Proteus rettgeri*, *Providencia stuartii*, *P. aeruginosa*, *Psychrobacter immobilis*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Shigella* spp., *S. marcescens*, e *Yersinia* spp. (JACOBY, 2009; PHILIPPON; ARLET; JACOBY, 2002). Em bactérias produtoras de AmpC cromossomal, a exposição a antimicrobianos β-lactâmicos pode induzir a superexpressão destas enzimas, o que pode ser a causa de falhas no tratamento, mesmo quando a bactéria apresenta susceptibilidade nos testes *in vitro* (HARRIS; FERGUSON, 2012).

As enzimas AmpC mediadas por plasmídeos podem ser classificadas em cinco grupos diferentes, de acordo com sua origem genômica: i) o grupo proveniente de *C. freundii*, representado pelas enzimas LAT e algumas enzimas do tipo CMY; ii) o grupo proveniente de *Enterobacter* spp., representado por MIR-1 e ACT-1; iii) o grupo proveniente de *M. morganii*, representado por DHA-1 e DHA-2; iv) o grupo proveniente de *H. alvei*, representado por AAC-1; e v) o grupo proveniente de *Aeromonas* spp., representado por enzimas do tipo MOX, FOX e outras do tipo CMY (PHILIPPON; ARLET; JACOBY, 2002). A enzima CMY-2, proveniente de *C. freundii*, é a AmpC mediada por plasmídeo mais prevalente em todo o mundo (JACOBY, 2009), sendo encontrada em diferentes gêneros bacterianos, isolados de diferentes fontes e regiões geográficas (ALCALA et al., 2016; HANSEN et al., 2016; MAC AOGAIN; ROGERS; CROWLEY, 2016; MOURA et al., 2017; PEYMANI et al., 2016; ROCHA et al., 2015).

2.2.4 GES-5

A enzima GES-5 é uma carbapenemase classificada no grupo 2f, de Bush-Jacoby, e na classe A, de Ambler (BUSH; JACOBY, 2010). Esta enzima é, geralmente, mediada por plasmídeos e tem capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e aztreonam (EL SALABI; WALSH; CHOUCHANI, 2013). A primeira descrição de GES-5 foi feita em 2004, em Atenas, na Grécia, em um isolado clínico de *E. coli* (VOURLI et al., 2004). Desde então, GES-5 tem sido descrita em isolados clínicos e ambientais de *P. aeruginosa* e enterobactérias, em diversas regiões do mundo (BONNIN et al., 2017; MALKOCOGLU et al., 2017; MANAGEIRO et al., 2014; PICÃO et al., 2009, 2010; WHITE et al., 2016).

No Brasil, a primeira descrição de GES-5 foi feita em 2007, em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, em São Luís, Maranhão (DA FONSECA et al., 2007). Nos anos seguintes, novos registros de *P. aeruginosa* produtora de GES-5 foram feitos em hospitais da cidade de São

Paulo (FEHLBERG et al., 2012; PICÃO et al., 2009; POLOTTO et al., 2012; RIZEK et al., 2014; XAVIER et al., 2010). Em 2010, foi feito o primeiro relato de GES-5 em uma enterobactéria, no Brasil. A enzima foi detectada em um isolado clínico de *K. pneumoniae*, também na cidade de São Paulo (PICÃO et al., 2010). Em 2014, GES-5 foi identificada na cidade e Porto Alegre, Rio Grande do Sul, em isolados de *Kluyvera intermedia*, de ambiente hospitalar (RIBEIRO et al., 2014b), e em um isolado clínico de *K. pneumoniae* (RIBEIRO et al., 2014a). Além dos ambientes hospitalares, GES-5 também foi encontrada em um *Enterobacter* spp. isolado de amostra de água de uma praia, no Rio de Janeiro (MONTEZZI et al., 2015).

2.3 Plasmídeos e a disseminação de genes codificadores de ESBLs

Plasmídeos são moléculas de DNA dupla-fita extra-cromossomal, circulares ou lineares, capazes de auto-replicação (LEPLAE et al., 2004). Apesar de não possuírem genes essenciais para o crescimento das células hospedeiras em ausência de estresse, eles possuem mecanismos de auto-replicação que também controlam o número de cópias e asseguram sua manutenção durante a divisão celular (NORDSTROM, 2006). A maioria dos plasmídeos carrega genes de resistência a antimicrobianos, os quais podem ser facilmente disseminados até mesmo entre bactérias de gêneros diferentes, através do processo de conjugação. Neste processo, os plasmídeos são transferidos pelo contato de uma célula doadora com uma célula receptora através do pilus sexual ou de adesinas. Este processo ocorre graças a uma maquinaria conjugativa codificada por genes presentes nos próprios plasmídeos. Adicionalmente, esta maquinaria pode permitir a mobilização de plasmídeos não-conjugativos, então denominados plasmídeos mobilizáveis (LAWLEY; FROST; WILKINS, 2004; SMILLIE et al., 2010; WOZNIAK; WALDOR, 2010).

Os plasmídeos conjugativos, geralmente, são plasmídeos grandes (>40 kb), com poucas cópias (de um a poucos por célula) e carreiam os genes necessários para a sua replicação e partição entre as células-filhas durante a divisão da célula bacteriana. Por outro lado, os plasmídeos não-conjugativos são menores em tamanho, possuem maior número de cópias (10 a 20 por célula), dependem da maquinaria da célula bacteriana para sua replicação e são distribuídos aleatoriamente entre as células-filhas durante a divisão celular (HOLMES; JOBLING, 1996). Frequentemente, múltiplos genes de resistência a antimicrobianos são carregados em um mesmo plasmídeo, conferindo vantagem adaptativa à bactéria hospedeira.

Esses plasmídeos, comumente, são conjugativos e possuem mais de 50 kb (NORDSTROM, 2006).

Visto que os plasmídeos são importantes veículos de disseminação de genes de resistência, os mesmos têm sido classificados em grupos de incompatibilidade plasmidial (Inc), como uma forma de caracterização epidemiológica. Plasmídeos que compartilham os mesmos controles de replicação (replicon) são considerados incompatíveis (pertencem ao mesmo Inc) e não podem permanecer na mesma linhagem celular (NOVICK, 1987). Atualmente, são conhecidos 27 grupos de incompatibilidade plasmidial em enterobactérias, dos quais os mais prevalentes são os das famílias IncF, IncA/C, IncL/M, IncI1, IncHI2 e IncN. Estes plasmídeos têm sido mundialmente descritos em bactérias de diferentes gêneros e fontes, sendo, portanto, considerados epidêmicos. Além disso, eles estão frequentemente associados com genes de resistência específicos (CARATTOLI, 2009, 2013).

Plasmídios pertencentes à família IncF são os principais responsáveis pela disseminação dos genes *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ e *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ associado com *bla*$_{\text{TEM-1}}$, *bla*$_{\text{OXA-1}}$ e *aac(6')-Ib-cr* (CARATTOLI, 2009, 2013). Estes plasmídeos, geralmente, possuem baixo número de cópias, variam de 50 a 200 kb em tamanho e possuem mais de um replicon (FII, FIA e FIB) (CARATTOLI et al., 2008; HOPKINS et al., 2006; VILLA et al., 2010). Os plasmídeos da família IncL/M estão relacionados com a disseminação do gene *bla*$_{\text{CTX-M-3}}$ na Europa e na Ásia. A disseminação do gene *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$, em isolados de origem humana e animal, tem sido atribuída a plasmídeos das famílias IncN e IncI1. Além disso, IncI1 tem sido associado aos genes *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ e *bla*$_{\text{CTX-M-3}}$. Já os plasmídeos IncHI2 foram associados à disseminação dos genes *bla*$_{\text{CTX-M-9}}$ e *bla*$_{\text{CTX-M-2}}$ em amostras clínicas de humanos e animais, em países da Europa e da Ásia. Os plasmídeos da família IncA/C, por sua vez, não estão fortemente associados à disseminação de genes codificadores de ESBLs, embora já tenham sido associados aos genes *bla*$_{\text{CTX-M-2}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-3}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ e *bla*$_{\text{CTX-M-56}}$, além de variantes de SHV e TEM (CARATTOLI, 2009, 2011, 2013).

2.4 β-lactamases em comunidades remotas

A disseminação de β-lactamases em ambientes hospitalares e em comunidades urbanas tem sido frequentemente descrita e é atribuída, de modo geral, ao uso indiscriminado de antimicrobianos em humanos e animais (ROCA et al., 2015; TANG; APISARNTHANARAK; HSU, 2014). Entretanto, alguns estudos têm relatado a presença de bactérias produtoras de β-lactamases em comunidades remotas com baixa ou mínima

exposição a antimicrobianos (BARTOLONI et al., 2004, 2009; GRENET et al., 2004; PALLECCHI et al., 2007; RUPPÉ et al., 2009; WOERTHER et al., 2010, 2013b).

Em 1999, um estudo realizado em uma região remota da Bolívia, com mínima exposição a antimicrobianos, investigou a presença de isolados de *E. coli* resistente a antimicrobianos na microbiota comensal de 108 indivíduos de uma comunidade de índios Guarani. Surpreendentemente, foi encontrado um alto índice de resistência a diferentes antimicrobianos e dentre os genes identificados, foi detectado o gene codificador de β-lactamase, $bla_{\text{TEM-1A}}$ em 78 isolados. Dentre as hipóteses levantadas para explicar tal acontecimento, a mais provável é a de que bactérias resistentes tenham sido introduzidas na comunidade após contato (mesmo que limitado) da sua população com populações de outras áreas e, a partir de então, esses isolados foram facilmente disseminados devido às condições precárias de higiene na comunidade. Quanto à manutenção e à disseminação desses isolados e de seus determinantes genéticos, mesmo na ausência de pressão seletiva, as possíveis causas sugeridas foram a exposição ambiental a organismos produtores de antimicrobianos e a seleção associada resultante da exposição a metais pesados (BARTOLONI et al., 2004).

Em um estudo realizado com índios Chayahuita de uma comunidade remota com mínima exposição a antimicrobianos, na Amazônia peruana, 111 isolados de *E. coli* provenientes de 82 indivíduos foram, também, avaliados quanto à sua resistência a antimicrobianos. Assim como no estudo conduzido na Bolívia, foi observado um alto índice de resistência a antimicrobianos de diferentes classes e o gene $bla_{\text{TEM-like}}$ foi detectado na maioria dos isolados. A hipótese levantada foi a de que os mínimos contatos com a área urbana (por exemplo, viagens esporádicas e animais selvagens) poderiam ter introduzido isolados resistentes e genes de resistência dentro dessa comunidade (BARTOLONI et al., 2009).

Em estudo semelhante, realizado no Senegal, em 2009, foi observada pela primeira vez a disseminação de enzimas do tipo CTX-M em comunidades remotas. Um clone de *E. coli* produtora de CTX-M-15 foi encontrado na microbiota comensal de duas crianças saudáveis que nunca tinham utilizado antimicrobianos. Nos dois isolados, o gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$ foi detectado em associação com os genes $bla_{\text{TEM-1}}$, $bla_{\text{OXA-1}}$, *aac(6')-Ib-cr* e *tet(A)*, em um único plasmídeo possuindo um replicon múltiplo (IncFIA, IncFIB e IncFII). Assim como nos estudos anteriores, os autores concluíram que a introdução e permanência do gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$ na microbiota comensal desses indivíduos teria se dado, possivelmente, pelo mínimo contato que os habitantes dessa comunidade tinham com outras áreas e com medicamentos alopáticos (RUPPÉ et al., 2009).

Já em uma comunidade de índios Wayampis, localizados em uma região remota da Guiana Francesa, foram realizados estudos ao longo de 10 anos, a fim de avaliar a disseminação da resistência a antimicrobianos em bactérias da microbiota comensal. O primeiro estudo foi realizado em 2001, quando foram avaliadas amostras de fezes de 93 indivíduos. Semelhantemente aos estudos conduzidos em outras comunidades, foi encontrado um alto índice de resistência a diferentes classes de antimicrobianos em bactérias Gram-negativas, das quais três isolados de *E. coli*, obtidos de três indivíduos, apresentaram o gene codificador de ESBL, $bla_{\text{TEM-52}}$. No mesmo período de estudo, havia a prevalência de enterobactérias produtoras de ESBL no hospital em que a população era hospitalizada, quando necessário. Portanto, considerando que os indivíduos avaliados no estudo não haviam ingerido antimicrobianos nem tinham sido hospitalizados há pelo menos um ano e que, até o momento, o gene $bla_{\text{TEM-52}}$ havia sido descrito apenas em ambientes hospitalares, os autores do estudo levantaram a hipótese de que esta cepa, ou outra, carregando o gene, tenha sido adquirida e disseminada na comunidade por indivíduos que não foram incluídos no estudo e foram hospitalizados durante o ano anterior ao estudo (GRENET et al., 2004).

Cinco anos depois, a ocorrência de ESBLs na microbiota intestinal dessa mesma população foi investigada novamente. O estudo foi realizado com 163 indivíduos, dos quais 50 já haviam participado do estudo anterior. A produção de ESBL foi observada em 14 cepas de enterobactérias, isoladas de 13 indivíduos, apresentando os genes $bla_{\text{CTX-M-2}}$ (carregados por plasmídeos das famílias IncI1, IncFIB, IncHI1 e outros não tipáveis), $bla_{\text{CTX-M-8}}$ (carregado por plasmídeo não tipável) e $bla_{\text{SHV-2}}$ (carregado por plasmídeos da família IncI1). Em comparação com o estudo realizado em 2001, foi observado o surgimento de ESBLs do tipo CTX-M, o que foi relacionado à provável introdução repetitiva de novas cepas e plasmídeos, bem como da disseminação entre indivíduos. Além disso, os autores também reportaram que durante esse período, houve um considerável aumento do consumo de antimicrobianos pelos indivíduos dessa população (WOERTHER et al., 2010).

Uma nova avaliação foi feita nessa comunidade no ano de 2010, com 151 dos 163 indivíduos que participaram do estudo realizado em 2006, e com a participação de mais três voluntários. Dessa vez, a prevalência de indivíduos portadores de enterobactérias produtoras de ESBL foi menor (8/154) em comparação ao último estudo realizado, provavelmente, devido à diminuição do uso de antimicrobiano pela população nesse período. Dos oito indivíduos portadores de ESBLs, foram isoladas 13 cepas de *E. coli* apresentado os genes $bla_{\text{CTX-M-1}}$ (n = 6; carregado por plasmídeos da família IncI1), $bla_{\text{CTX-M-8}}$ (n = 5; carregados por plasmídeos da família IncI1 e por plasmídeos não tipáveis) e $bla_{\text{CTX-M-2}}$ (n = 2; carregados

por plasmídeos das famílias IncFIB, IncI1, IncHI2 e por plasmídeos não tipáveis). Como conclusão, os autores mantiveram a hipótese já sugerida nos estudos anteriores, de que cepas produtoras de ESBLs têm sido constantemente introduzidas na comunidade a partir de áreas externas. Além disso, eles destacaram a importância dos plasmídeos na disseminação de genes de resistência entre cepas de *E. coli* da microbiota comensal dos indivíduos, visto que o gene $bla_{\text{CTX-M-1}}$ foi encontrado em cepas não relacionadas, presentes em diferentes indivíduos, portanto carregados por um único grupo plasmidial (WOERTHER et al., 2013b).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a produção de beta-lactamases na microbiota Gram-negativa comensal de humanos e animais domésticos de uma comunidade indígena situada no interior do estado do Amazonas, e estabelecer as correlações genéticas entre os isolados.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a ocorrência e a diversidade de bactérias Gram-negativas produtoras de beta-lactamases na microbiota comensal de humanos e animais domésticos na comunidade de estudo;
- Avaliar os perfis fenotípico e genotípico dos isolados produtores de beta-lactamases;
- Avaliar a diversidade clonal dos isolados resistentes e compará-los genotipicamente a clones circulantes, pela técnica de Tipagem de Sequência Multi Locus;
- Avaliar a possível transmissão de bactérias produtoras de beta-lactamases entre humanos e animais domésticos, através da análise e comparação dos perfis fenotípicos e genotípicos dos isolados;
- Avaliar a transferibilidade plasmidial dos genes codificadores de beta-lactamases, pelas técnicas de conjugação e transformação;
- Caracterizar os plasmídios carreadores dos genes de resistência aos beta-lactâmicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População de estudo

A população de estudo foi representada por indivíduos pertencentes a 12 etnias indígenas (Baniwa, Baré, Daw, Hupda, Kuripaco, Piratapuya, Tariano, Tukano, Wanano, Werequino, Yanomami e Yepá-Mahsã), habitando no município de São Gabriel da Cachoeira, localizado na região noroeste do estado do Amazonas – mais especificamente na bacia do Alto Rio Negro – na fronteira com a Colômbia e a Venezuela (Figura 2). O município possui uma área de 109.183,434 km^2 e uma população de 37.896 habitantes, dos quais 29.017 (76,6%) são indígenas, representando 23 etnias distintas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010; SOARES, 2012).

Figura 2 - Mapa de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas

Fonte: Adaptada de Google Maps, 2017.

A cidade de São Gabriel da Cachoeira, sede do município, está situada em uma região de difícil acesso, circundada por floresta, a 851,23 km de Manaus (IBGE, 2010; SOARES, 2012). A distância, por navegação, entre a cidade de São Gabriel da Cachoeira e a comunidade mais próxima – comunidade de Tunuí-Cachoeira, no rio Içana – é de 200 km, seguida da cidade de Santa Isabel do Rio Negro, a 280 km (FEDERAÇÃO DAS

ORGANIZAÇÕES INDÍGENAS DO RIO NEGRO, 2017). A única estrada existente nas proximidades é a BR-307, que liga São Gabriel da Cachoeira ao distrito de Cucuí, na fronteira com a Venezuela, a uma distância de 300 km. Entretanto, essa estrada é pouco utilizada devido às más condições de manutenção da mesma. De modo geral, as únicas formas de acesso à cidade são por meio de avião ou barco. O transporte aéreo, todavia, é bastante restrito, visto que depende de certa previsibilidade e compra antecipada de bilhetes. Dessa forma, o tráfego de pessoas e mercadorias se dá, quase que exclusivamente, por navegação no Rio Negro (SOARES, 2012).

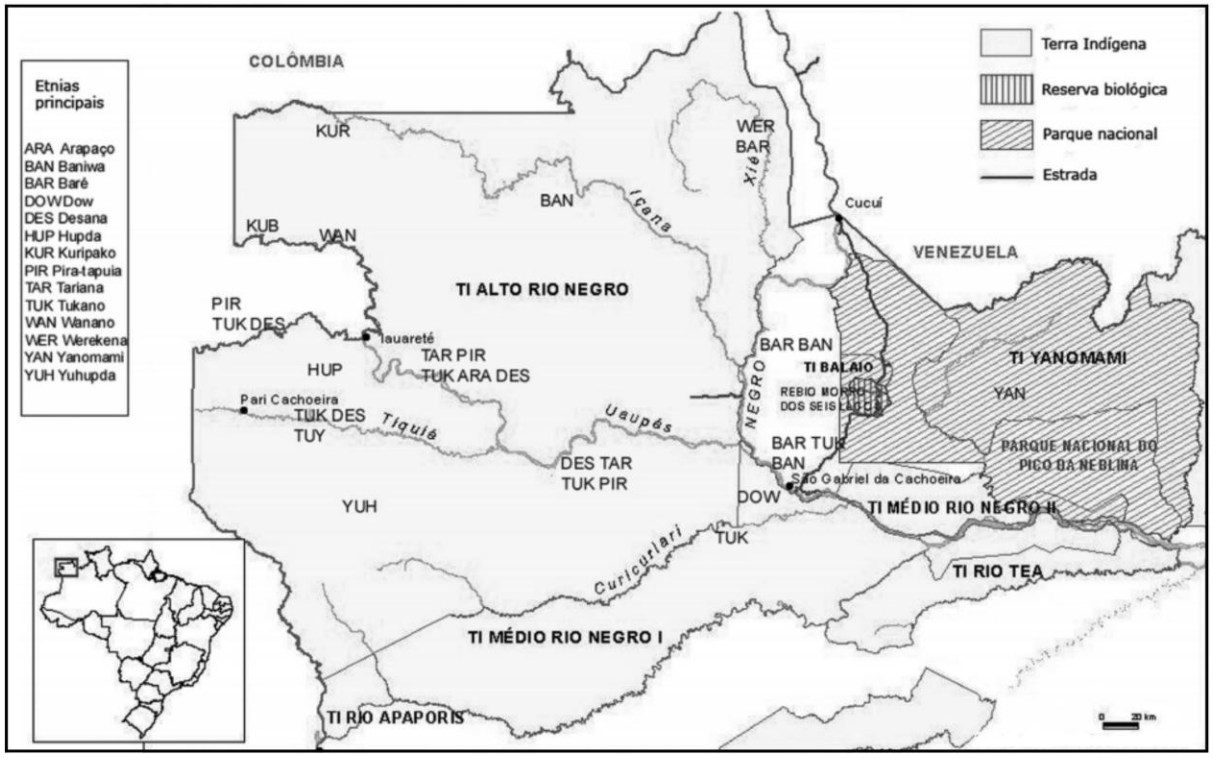
Na sede do município, as comunidades indígenas se distribuem, principalmente, nos bairros mais periféricos (AMAZONENSE, 2013). Contudo, não há distinção significativa entre a região central e a região periférica da cidade, e a proximidade com floresta é igual para ambas as regiões (SOARES, 2012). Além do "núcleo urbano", também há comunidades indígenas distribuídas no distrito de Iauaretê e ao longo de rios que cortam o município, como os rios Negro, Uaupés, Içana, Xie e Tiquié (AMAZONENSE, 2013; Figura 3). Além disso, muitos indivíduos praticam uma "rotatividade habitacional" entre a cidade e as comunidades rio acima e floresta adentro, onde tempos habitam na cidade e tempos habitam nessas comunidades, e vice-versa (LEINER, 2014).

O abastecimento de água na sede do município é feito por dois sistemas distintos: i) captação direta da água do rio Negro e distribuição por meio de ligações domiciliares ou ii) captação de água através de perfuração de poços artesianos, armazenamento em caixas d'água e distribuição em torneiras públicas, sem ligações domiciliares. Em ambos os sistemas de captação, a água não recebe nenhum tratamento para torná-la potável. Alguns moradores perfuram poços particulares em seus próprios quintais e captam a água da chuva para diversos usos. Nas comunidades, a água é captada nos igarapés, nas nascentes de água ou diretamente do rio. Como não há sistema de coleta e tratamento de esgotos, é comum a poluição dos cursos d'água que cortam a cidade. Somente em uma via pública da sede do município ocorre captação de esgotos por drenagem de águas pluviais. Entretanto, esses efluentes são lançados em igarapés e, posteriormente, deságuam no rio Negro, à montante do ponto de captação de água. Além disso, os resíduos sólidos coletados na cidade são lançados, sem nenhum critério, à beira de um igarapé afluente do rio Negro (GIATTI, 2007).

A principal atividade no município é a agricultura de subsistência, caracterizada pelo cultivo de mandioca, de outros tubérculos, de grãos e de frutas. A alimentação é complementada com frutas do mato e produtos de caça e pesca. Algumas famílias criam galinhas e porcos e, eventualmente, gado bovino. No entanto, na sede do município, a maioria

dos produtos alimentícios é importada, uma vez que a produção local não é suficiente para suprir as necessidades da população (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO, 2009).

Figura 3 - Mapa de distribuição das etnias indígenas no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas



Fonte: Eloy; Lasmar, 2011.

Em relação ao sistema local de saúde, ocorre uma mesclagem entre as práticas de medicina tradicional da região e a medicina ocidental, que é representada, principalmente, pelo Hospital de Guarnição de São Gabriel da Cachoeira (HGuSGC) e pela Casa de Apoio à Saúde Indígena (CASAI). O HGuSGC é uma unidade de saúde do Exército Brasileiro que presta atendimento ambulatorial e hospitalar de média complexidade. Já a CASAI, presta atendimento ambulatorial, em nível de atenção básica de saúde, para pacientes que se localizam em aldeias isoladas no interior da floresta (comunicação pessoal).

3.2 Amostras biológicas

Frente ao achado de isolados bacterianos com perfil de multi-resistência em pacientes internados no HGuSGC, no ano de 2012, o Capitão Farmacêutico, chefe do Laboratório de Análises Clínicas do HGuSGC na época, solicitou autorização para coleta de amostras de

fezes de indivíduos atendidos na CASAI e de funcionários da equipe técnica do local, a fim de investigar a disseminação de bactérias com fenótipos de resistência preocupantes na comunidade. Depois de obtida a autorização, no mês de março de 2013 foram coletadas amostras de 36 indivíduos atendidos na CASAI, sem sintomas de infecção intestinal, pertencentes às etnias Baniwa (*n* = 6), Baré (*n* = 2), Daw (*n* = 1), Hupda (*n* = 6), Kuripaco (*n* = 1), Piratapuya (*n* = 3), Tariano (*n* = 5), Tukano (*n* = 3), Wanano (*n* = 1), Werequino (*n* = 1), Yanomami (*n* = 1), Yepá-Mahsã (*n* = 4) e etnia não identificada (*n* = 2). Adicionalmente, amostras de fezes foram coletadas de nove funcionários da equipe técnica, também sem sintomas de infecção intestinal, representados por seis indivíduos indígenas, das etnias Baré (*n* = 3) e Tukano (*n* = 3), e três indivíduos não indígenas.

Além disso, foram coletadas amostras de swab retal de cães (*n* = 18) e gatos (*n* = 2) encontrados nas imediações da CASAI, do HGuSGC e do CREAM (Centro de Referência Especializada Ambulatorial), no mês de julho de 2013. Uma semana após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas, do Instituto de Ciências Biomédicas II/Universidade de São Paulo (ICB II/USP), em meio de transporte Stuart.

3.3 Triagem e isolamento das bactérias Gram-negativas resistentes

As amostras, contidas em swab retal, foram transferidas para tubos de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas a 36 ºC, por aproximadamente 18 horas. Em seguida, essas amostras foram estriadas em placas de ágar MacConkey suplementado com 1 µg/mL de ceftriaxona (para seleção de cepas resistentes a cefalosporinas), em placas de ágar MacConkey suplementado com 16 µg/mL de ácido nalidíxico (para seleção de cepas resistentes a quinolonas) e em placas de CHROMagar ESBL (para seleção de cepas produtoras de ESBL). As diferentes colônias crescidas nas placas foram, então, selecionadas e submetidas a teste de susceptibilidade antimicrobiana para avaliação do perfil fenotípico de resistência.

3.4 Teste de susceptibilidade antimicrobiana e caracterização fenotípica de ESBL e AmpC

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pelo método qualitativo de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966). Foram testados antimicrobianos da classe dos β-lactâmicos com inibidores de β-lactamases (amoxacilina/ácido clavulânico), das cefalosporinas (cefoxitina,

cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e cefepima), dos carbapenêmicos (imipenem, ertapenem e meropenem), das quinolonas (ácido nalidíxico e ciprofloxacina), dos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), das sulfas (sulfametoxazol/trimetoprim), das glicilciclinas (tigeciclina) e das fosfomicinas (fosfomicina). Após crescimento bacteriano em placas de ágar MacConkey por um período de 18 a 24 horas, uma única colônia de cada isolado foi inoculada em caldo Mueller Hinton e incubada a 37 ºC, sob agitação, até atingir turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland. Em seguida, as suspensões bacterianas foram semeadas em placas de ágar Mueller-Hinton, com auxílio de swab estéril. Os discos de antimicrobianos foram dispostos sobre as placas de forma a já triar a produção de ESBL e AmpC. Para a triagem de isolados produtores de ESBL foi utilizado o método de disco aproximação (JARLIER et al., 1988), em que um disco de amoxacilina com ácido clavulânico (30 µg) foi colocado no centro das placas e discos de ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) e cefepima (30 µg) foram dispostos a 2,5 cm de distância do mesmo. A triagem para produção de AmpC foi feita pela disposição de um disco de ceftazidima (30 µg) a 3 cm de distância de um disco de imipenem (10 µg). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica, a 37 ºC, por um período de 18 a 24 horas. Após este período, foi realizada a leitura dos halos de inibição e os resultados foram interpretados com base nos valores de referência estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (CLSI, 2013), com exceção de tigeciclina, cujos resultados foram interpretados de acordo com o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST* (EUCAST, 2014). A produção de ESBL foi considerada positiva quando houve aparecimento de uma zona fantasma ou alargamento do halo de inibição da cefalosporina. Para avaliar a produção de AmpC foi observado se houve achatamento do halo de inibição da ceftazidima por ação do imipenem (inibidor). A cepa de *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como cepa referência para controle de qualidade.

Os isolados que apresentaram perfil de resistência às quinolonas (sem perfil de resistência a β-lactâmicos) não foram submetidos às etapas seguintes de caracterização, visto que serão utilizados em um projeto de pesquisa de outro aluno de doutorado.

3.5 Identificação das espécies bacterianas

A identificação das espécies foi feita pela técnica de MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*), a qual gera impressões espectrais de massa únicas para cada bactéria, permitindo diferenciá-las (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

Após crescimento de 18 a 24 horas em placas de ágar c uma única colônia de cada isolado foi selecionada com um palito de madeira e espalhada em uma fina camada sobre a superfície de um poço de uma placa metálica condutora. Após o preenchimento de todos os poços da placa com os isolados a serem testados, foi adicionado 1 μL da matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico sobre cada poço, para cristalização da amostra, e esperou-se secar à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi introduzida no espectrômetro de massas (MALDI Biotyper; Bruker Daltonik) e foi bombardeada com pulsos de laser curtos. Dentro do aparelho, a matriz absorveu a energia do laser que permitiu a dessorção dos analitos, os quais foram vaporizados e ionizados na fase gasosa. Estas moléculas foram aceleradas através de um campo eletrostático e ejetadas através de um tubo metálico de voo, o qual foi submetido a um vácuo até que as moléculas alcançassem o detector. Os analitos foram, então, separados de acordo com o seu tempo de voo (*time-of-flight - TOF*), que é dependente de sua massa (m) e de sua carga (z), criando, assim, um espectro de massa composto por picos de massa/carga com diferentes intensidades. A análise foi realizada pelo software MALDI Biotyper OC versão 3.1.66, comparando o espectro obtido com um banco de dados de espectros de diferentes espécies bacterianas (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012). Para cada isolado, foram analisadas três preparações.

3.6 Extração de DNA genômico para reação em cadeia da polimerase (PCR)

Todos os isolados que apresentaram perfil de resistência de interesse tiveram o DNA genômico extraído pelo método de fervura, segundo Chapman et al. (2001) com modificações.

Após crescimento de 18 a 24 horas em placas de ágar MacConkey, uma única colônia de cada isolado foi inoculada em 3 mL de caldo BHI. Essa suspensão foi mantida a 37 °C, por 18 a 24 horas, sob agitação. Em seguida, 1,5 mL de cada suspensão foram centrifugados a 14.000 rpm (rotações por minuto), durante 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi pesado em balança de alta precisão. O sedimento foi resuspendido em água Mili-Q estéril, em volume equivalente ao seu peso multiplicado por 10, e incubado em banho-seco a 100 °C, por 10 minutos, e, imediatamente depois, colocado em banho de gelo, por 5 minutos. Por fim, foi realizada centrifugação a 9.000 rpm, por 15 minutos, e o sobrenadante (contendo o DNA genômico) foi transferido para um novo tubo e estocado em freezer à -20 °C.

3.7 Identificação dos genes codificadores de ESBL pela técnica de PCR

Os isolados que apresentarem perfil fenotípico positivo para a produção de ESBL, foram avaliados quanto à presença dos genes *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$ e *bla*$_{CTX-M}$ (incluindo os grupos *bla*$_{CTX-M-1}$, *bla*$_{CTX-M-2}$, *bla*$_{CTX-M-8}$, *bla*$_{CTX-M-9}$ e a variante *bla*$_{CTX-M-15}$). A presença do gene *bla*$_{GES-type}$ foi avaliada em um isolado que apresentou resistência a cefalosporinas e imipenem. Os iniciadores utilizados são mostrados na tabela 3.

A amplificação dos genes alvo foi realizada em reações de 25 µL contendo 100 ng de DNA; tampão de PCR 1X [Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl] (Fermentas, USA), 2,5 mM de $MgCl_2$ (Fermentas); 2 mM de cada dNTP (Fermentas); 0,05 µM de cada iniciador e 0,05 U/ µL de Taq DNA polimerase (Fermentas).

As condições de amplificação foram as seguintes: 1) desnaturação inicial a 94 ºC, por 5 minutos; 2) desnaturação a 94 ºC, por 1 minuto; 3) anelamento com temperatura específica para cada iniciador, por 1 minuto; 4) extensão a 72 ºC, por 1 minuto; 5) repetição das etapas 2, 3 e 4, por 29 vezes; 6) extensão final a 72 ºC, por 5 minutos. Posteriormente, os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X, a 90V (Volts). Foi utilizado um marcador de peso molecular de DNA 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific) e, também, controles positivos e negativos para cada gene, a fim de validar as reações de PCR. As bandas de DNA foram coradas com GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium, Hayward, 2013) e visualizadas sob luz ultra-violeta (L-Pix, Loccus Biotecnologia).

Para confirmação dos resultados positivos, os produtos de PCR foram encaminhados para sequenciamento pelo método de Sanger. A purificação das amostras foi realizada com o kit de purificação illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) conforme recomendações do fabricante. A concentração de DNA purificado foi avaliada em gel de agarose a 2%, utilizando o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Em seguida, os amplicons foram enviados para sequenciamento no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL) da USP. A análise das sequências foi realizada através de alinhamento de nucleotídeos utilizando a ferramenta *online* BLAST.

Tabela 3 - Iniciadores específicos para genes de resistência codificadores de ESBL

Grupo	Sequência do iniciador (5'-3')	Pb*	T(°C)**	Referência
bla_{TEM}	F: CGWGTCGCCCTTATTCCT	839	55	DROPA, 2012
	R: CCAAWGCTTAATCAGTGAG			
bla_{SHV}	F: ATGCGTTATATTCGCCTGTG	860	58	SPANU et al., 2002
	R: GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG			
bla_{CTX-M}	F: CGCTTTGCGATGTGCAG	550	49	BONNET et al., 2001
	R: ACCCGCGATATCGTTGGT			
$bla_{CTX-M-1}$	F: GGTTAAAAAATCACTGCGTC	542	55	GARREC et al., 2011
	R: TTGGTGACGATTTTAGCCGC			
$bla_{CTX-M-2}$	F: GACTCAGAGCATTCGCCGC	870	55	DROPA et al., 2015
	R: TCAGAAACCGYGGGTTACGA			
$bla_{CTX-M-8}$	F: GATGAGACATCGCGTTAAG	861	60	DROPA et al., 2015
	R: GGTGACGATTTTCGCGGCA			
$bla_{CTX-M-9}$	F: ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	833	55	GARREC et al., 2011
	R: CCCTTCGGCGATGATTCT			
$bla_{CTX-M-15}$	F: CACACGTGGAATTTAGGGACT	995	56	MUZAHEED et al., 2008
	R: GCCGTCTAAGGCGATAAACA			
$bla_{GES-type}$	F: CTATTACTGGCAGGGATCG	594	53	MONTEIRO et al., 2012
	R: CCTCTCAATGGTGTGGGT			

*Pb, pares de bases; **T(^{o}C), temperatura de anelamento em graus Celsius.

3.8 Determinação dos filogrupos de *E. coli*

Os isolados de *E. coli* encontrados neste estudo foram submetidos a reações de PCR para avaliar a presença ou ausência dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TspE4.C2, e assim classifica-los em diferentes filogrupos de virulência (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). O preparo das reações, as condições de amplificação e a corrida de eletroforese foram realizadas como descrito no item 3.7. Os iniciadores utilizados são mostrados na tabela 4.

Tabela 4 - Iniciadores utilizados para determinação dos filogrupos de *E. coli* (continua)

Gene alvo	Sequência do iniciador (5'-3')	Pb*	T (°C)**	Referência
chuA	F: GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	59	(CLERMONT; BONACORSI;
	R: TGCCGCCAGTACCAAAGACA			BINGEN, 2000)
yjaA	F: TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211	59	(CLERMONT; BONACORSI;
	R: ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC			BINGEN, 2000)

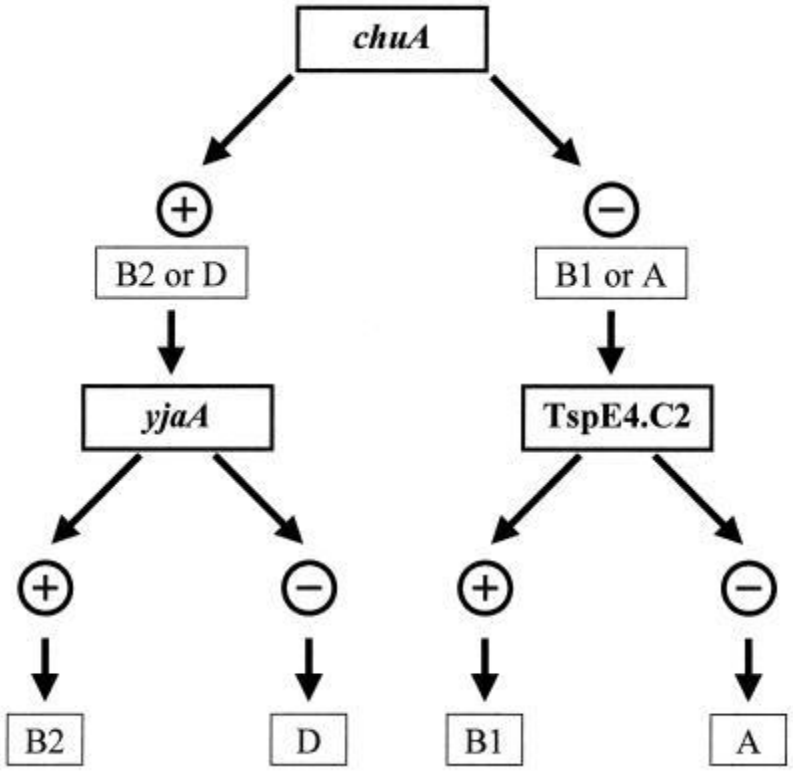
*Pb, pares de bases; **T(^{o}C), temperatura de anelamento em graus Celsius.

Tabela 4 – Iniciadores utilizados para determinação dos filogrupos de *E. coli* (continuação)

Gene alvo	Sequência do iniciador (5'-3')	Pb*	T (°C)**	Referência
TspE4.C2	F: GAGTAATGTCGGGGCATTCA R: CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	59	(CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000)

*Pb, pares de bases; **T(^{o}C), temperatura de anelamento em graus Celsius.

Figura 4 - Representação esquemática da determinação dos filogrupos de *E. coli*



Fonte: Clermont; Bonacorsi; Bingen, 2000.

3.9 Genotipagem dos isolados por ERIC-PCR

Os perfis genotípicos dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* foram determinados pela técnica de Sequências Repetitivas de Consenso Intergênico em Enterobactérias (do inglês, *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence* – ERIC-PCR), que consiste na amplificação de regiões conservadas do DNA de enterobactérias. A amplificação dessas regiões foi feita por PCR, a partir de um marcador específico (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC-3') (AYDIN et al., 2007).

As condições de amplificação foram as seguintes: 1) desnaturação inicial a 94 ºC, por 10 minutos; 2) desnaturação a 94 ºC, por 1 minuto; 3) anelamento a 52 ºC, por 1 minuto; 4) extensão a 72 ºC, por 1 minuto; 5) repetição das etapas 2, 3 e 4, por 29 vezes; 6) extensão final a 72 ºC, por 16 minutos. Posteriormente, os produtos da PCR foram submetidos a

eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X, a 90V (Volts), por 90 minutos. Foi utilizado um marcador de peso molecular de DNA 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific) dos dois lados do gel. As bandas de DNA foram coradas com GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium, Hayward, 2013) e visualizadas sob luz ultra-violeta (L-Pix, Loccus Biotecnologia). Os padrões de bandas gerados foram analisados pelo software Bionumerics versão 6.6 (Applied Maths, St-Martens-Latern, Bélgica). Os dendrogramas foram construídos com método UPGMA e coeficiente Dice, com 0,5% de otimização e tolerância de 1,5%, para os isolados de *E. coli*, e 3,4%, para os isolados de *K. pneumoniae*.

3.10 Genotipagem por tipagem de sequências de multilocus (MLST)

A genotipagem pela técnica de tipagem de sequências de multilocus (do inglês, *multilocus sequence typing*) foi realizada para os isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. asburiae* e *E. kobei*. A técnica consiste na caracterização genotípica dos isolados a partir do sequenciamento de genes conservados de cada espécie bacteriana, onde diferentes sequências são classificadas como diferentes alelos (URWIN; MAIDEN, 2003).

Foram amplificados sete genes conservados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* (complexo *E. cloacae*, que inclui *E. asburiae* e *E. kobei*), utilizando iniciadores e condições de amplificação descritos nos respectivos *websites*, com algumas adaptações nas temperaturas de anelamento (Tabelas 5, 6 e 7). A amplificação dos genes foi realizada em reações de 50 µL contendo as mesmas proporções de reagentes e de DNA previamente descritas no item 3.7. As condições de amplificação, a corrida de eletroforese e a purificação dos produtos de PCR também foram realizadas conforme descrito neste mesmo item. Os amplicons foram sequenciados, pelo método de Sanger, no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL) da USP e na empresa Genomic Engenharia Molecular.

Tabela 5 - Iniciadores utilizados para genotipagem de *E. coli* por MLST (continua)

Gene	Proteína codificada	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Pb*	T(°C)**
adk	adenilato quinase	F: ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	583	62,5
		R: CCGTCAACTTTCGCGTATTT		
fumC	fumarato hidratase	F: TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806	62,5
		R: GTACGCAGCGAAAAAGATTC		

*Pb, pares de bases; **T(^{o}C), temperatura de anelamento em graus Celsius.
Fonte: Adaptada de Wirth et al., 2006.

Tabela 5 - Iniciadores utilizados para genotipagem de *E. coli* por MLST (continuação)

Gene	Proteína codificada	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Pb*	T(°C)**
gyrB	subunidade B da DNA girase	F: TCGGCGACACGGATGACGGC	911	62,5
		R: ATCAGGCCTTCACGCGCATC		
icd	isocitrato/isopropilmalato desidrogenase	F: ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGC	878	62,5
		R: GGACGCAGCAGGATCTGTT		
mdh	malato desidrogenase	F: AGCGCGTTCTGTTCAAATGC	932	62,5
		R: CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT		
purA	adenilosuccinato desidrogenase	F: CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816	62,5
		R: CATACGGTAAGCCACGCAGA		
recA	proteína de ligação de ATP/GTP	F: CGCATTCGCTTTACCCTGACC	780	62,5
		R: TCGTCGAAATCTACGGACCGGA		

*Pb, pares de bases; **T(^{o}C), temperatura de anelamento em graus Celsius.
Fonte: Adaptada de Wirth et al., 2006.

Tabela 6 - Iniciadores utilizados para genotipagem de *K. pneumoniae* por MLST

Gene	Proteína codificada	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Pb*	T(°C)**
gapA	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	F: TGAAATATGACTCCACTCACGG	662	60
		R: CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT		
infB	fator de iniciação da tradução	F: CTCGCTGCTGGACTATATTCG	462	50
		R: CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC		
mdh	malato desidrogenase	F: CCCAACTCGCTTCAGGTTCAG	756	50
		R: CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG		
pgi	fosfoglicose isomerase	F: GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	566	50
		R: CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT		
phoE	fosforina E	F: ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	602	50
		R: TGATCAGAACTGGTAGGTGAT		
rpoB	subunidade beta da RNA polimerase	F: GGCGAAATGGCWGAGAACCA	1075	50
		R: GAGTCTTCGAAGTTGTAACC		
tonB	transdutor de energia periplásmico	F: CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	539	48
		R: ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG		

*Pb, pares de bases; **T(^{o}C), temperatura de anelamento em graus Celsius.
Fonte: Adaptada de Diancourt et al., 2005.

Tabela 7 - Iniciadores utilizados para genotipagem de *E. asburiae* e *E. kobei* (complexo *E. cloacae*) por MLST (continua)

Gene	Proteína codificada	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Pb*	T(°C)**
dnaA	iniciador da replicação cromossomal	F: AYAACCCGCTGTTCCTBTATGGCGGCAC	1151	58
		R: KGCCAGCGCCATCGCCATCTGACGCGG		

*Pb, pares de bases; **T(^{o}C), temperatura de anelamento em graus Celsius.
Fonte: Adaptada de Miyoshi-Akiyama et al., 2013.

Tabela 7 - Iniciadores utilizados para genotipagem de *E. asburiae* e *E. kobei* (complexo *E. cloacae*) por MLST (continuação)

Gene	Proteína codificada	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Pb*	T(°C)**
fusA	fator G de elongação	F: TCGCGTTCGTTAACAAAATGGACCGTAT	906	58
		R: TCGCCAGACGGCCCAGAGCCAGACCCAT		
gyrB	subunidade B da DNA girase	F: TCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAA	1153	58
		R: GCAGAACCGCCCGCGGAGTCCCCTTCCA		
leuS	leucil-tRNA sintetase	F: GATCARCTSCCGGTKATCCTGCCGGAAG	845	60
		R: ATAGCCGCAATTGCGGTATTGAAGGTCT		
pyrG	CTP sintase	F: AYCCBGAYGTBATTGCRCAYMAGGCGAT	535	60
		R: GCRCGRATYTCVCCCTSHTCGTCCCAGC		
rplB	proteína ribossomal 50S subunidade L2	F: GTAAACCGACATCTCCGGGTCGTCGCCA	746	55
		R: ACCTTTGGTCTGAACGCCCCACGGAGTT		
rpoB	subunidade beta da RNA polimerase	F: AAAAACGTATTCGTAAGGATTTTGGTAA	944	55
		R: CCAGCAGATCCAGGCTCAGCTCCATGTT		

*Pb, pares de bases; **T(^{o}C), temperatura de anelamento em graus Celsius.
Fonte: Adaptada de Miyoshi-Akiyama et al., 2013.

A análise das sequências foi realizada através do software BioEdit e a determinação dos alelos foi feita através da comparação com sequências depositadas nos bancos de dados dos *websites* correspondentes à cada espécie analisada. A combinação dos alelos e a determinação dos tipos de sequência (ST) foi feita pelos próprios *websites*. Isolados de *E. coli* que apresentaram algum alelo com sequência diferente das já depositadas no banco de dados foram classificados como ST desconhecido. Esses isolados tiveram seu genoma completo sequenciado e, posteriormente, os dados do sequenciamento foram submetidos ao *website* EnteroBase para determinação do número do novo alelo e definição do novo ST.

3.11 Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial foi realizada pelo método de lise alcalina, descrito por Birnboim & Doly (BIMBOIM; DOLY, 1979), com algumas modificações propostas pela Profª. Dra. Rosa Maria Silva (Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP). Uma única colônia de cada isolado foi inoculada em 3 mL de caldo TSB (caldo Soja Tripticaseína) e incubada a 37 °C, por 16 a 20 horas, sem agitação. Alíquotas de 1 mL de cada suspensão foram submetidas à centrifugação a 12.000 rpm, por 3 minutos, os sobrenadantes foram removidos e os sedimentos foram ressuspensos em 100 µL da solução I (2 mg/mL de lisozima, 2% de glicose, 10 mM de EDTA, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 1 mg/mL de

RNAse). Após 30 minutos de incubação em banho de gelo, foram adicionados 200 µL da solução II (0,2 N de NaOH e 1% de SDS), as suspensões foram homogeneizadas por inversão e mantidas em banho de gelo por 7 minutos. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução III (3 M de acetato de sódio, pH 4,8), as suspensões foram homogeneizadas por inversão e mantidas em banho de gelo por 1 hora e 30 minutos, para precipitação do DNA cromossômico. Após esse período, as suspensões foram centrifugadas a 12.000 rpm, durante 10 minutos, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e adicionou-se 1 mL de etanol gelado, homogeneizando por inversão, para precipitação do DNA plasmidial. Após incubação a -20 °C, por uma noite, as suspensões foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 10 minutos, e os sedimentos foram ressuspensos em 100 µL da solução IV (100 mM de acetato de sódio, pH 8,0). O DNA plasmidial foi novamente precipitado, por adição de 200 µL de etanol gelado e incubação a -20 °C por uma noite. Por fim, foi realizada nova centrifugação a 12.000 rpm, por 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram secos e ressuspensos em 20 µL de água Mili-Q estéril. As extrações foram mantidas em geladeira (4 – 8 °C) durante a noite, para melhor eluição do DNA plasmidial, e, posteriormente, armazenadas a -20 °C.

3.12 Mobilização dos genes de resistência

3.12.1 Conjugação

Os ensaios de conjugação foram feitos com a finalidade de averiguar a presença de plasmídeos conjugativos. Foram utilizadas como cepas receptoras *E. coli* J53 azida resistente (para os isolados lactose negativos), *E. coli* C600 estreptomicina resistente, mutantes de *E. coli* C600 azida resistentes e *E. coli* HB101 azida resistente (para os isolados lactose positivos). As cepas doadoras e receptoras foram incubadas em caldo TSB por 4 horas, a 37 °C, e, em seguida, foram preparadas suspensões de 3:1:1 (receptora:doadora:meio) e de 1:10 (doadora:receptora). Essas suspensões foram mantidas à temperatura ambiente e a 37 °C, por um período de 18 horas, sem agitação. Após esse período, uma alíquota de 100 µL de cada mistura foi inoculada em placas de ágar McConkey com 2 µg/mL de ceftriaxona e 200 µg/mL de azida (para suspensões com *E. coli* J53, *E. coli* C600 e *E. coli* HB101azida resistente como receptoras) ou em placas de ágar McConkey com 2 µg/mL de ceftriaxona e 2 mg/mL de estreptomicina (para suspensões com *E. coli* C600 estreptomicina resistente como receptora). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C, por 24 a 48 horas. As colônias que cresceram

nas placas foram selecionadas e submetidas a antibiograma e a PCR para confirmação da transferência dos genes de resistência. No antibiograma, além dos antibióticos testados previamente nas cepas selvagens, foram testados estreptomicina, tobramicina e tetraciclina.

3.12.2 Preparo de células eletrocompetentes e transformação por eletroporação

Para o preparo das células eletrocompetentes, uma única colônia de *E. coli* DH5α foi inoculada em 2 mL de caldo LB (Luria Bertani) e incubada a 37 °C, por 18 a 24 horas, sob agitação. Após este período, o inóculo foi transferido para 50 mL de caldo LB e mantido a 37 °C, sob agitação, até atingir uma densidade ótica (DO_{600nm}) de 0,6 a 0,8. A cultura bacteriana foi resfriada em gelo por 15 minutos e, em seguida, centrifugada a 8.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C. O sedimento foi ressuspenso em 50 mL de água Mili-Q estéril gelada e este processo de lavagem foi repetido mais duas vezes. Em seguida, o sedimento foi lavado com glicerol 10% gelado, ressuspenso em 5 mL de glicerol 10% gelado e distribuído em alíquotas de 40 µL, em microtubos. As células foram armazenadas a -80 °C e, no momento do uso, foram descongeladas em gelo.

As transformações foram feitas pela adição de 10 µL de DNA plasmidial (dos isolados que não apresentaram resultados positivos na conjugação) a 40 µL de células eletrocompetentes. Estas misturas de células e DNA foram transferidas para cubetas de eletroporação de 2 mm e submetidas a um choque elétrico de 2,5 kV (Eppendorf® Electroporator 2510). Logo em seguida, as células foram transferidas para 1 mL de caldo LB e incubadas a 37 °C, por 1 hora e 30 minutos, sob agitação. Após este período, 100 µL de cada suspensão foram plaqueados em ágar LB suplementado com 2 µg/mL de ceftriaxona e em ágar LB sem antimicrobiano (controle positivo de crescimento). As placas foram mantidas em estufa, a 37 °C, por 18 a 24 horas.

3.12.3 Preparo de células termocompetentes e transformação por choque térmico

Para o preparo das células termocompetentes, uma única colônia de *E. coli* DH5α foi inoculada em 3 mL de caldo LB (Luria Bertani) e incubada a 37 °C, por 18 a 24 horas, sob agitação. Após este período, 200 µL desta cultura foram inoculados em 20 mL de caldo LB (diluição 1:100) e esta suspensão foi mantida a 37 °C, sob agitação, até atingir uma DO_{600nm} de 0,2 a 0,4. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 4.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C. O sedimento foi ressuspenso em 9 mL, com tampão $CaCl_2$ 0,1 M, e mantido no gelo por 1 hora

e 30 minutos. Foi realizada uma nova centrifugação a 4.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 900 µL de $CaCl_2$ 0,1 M e 90 µL de glicerol 10% gelado. As células foram distribuídas em microtubos, em alíquotas de 50 µL, mantidas em gelo por 30 minutos, e, por fim, armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

As transformações foram feitas pela adição de 2 µL de DNA plasmidial (dos isolados que não apresentaram resultados positivos na conjugação) a 50 µL de células competentes. Estas misturas de células e DNA foram incubadas em gelo por 30 minutos, posteriormente inseridas em banho-maria por 30 segundos, a 42 °C e, imediatamente, inseridas em gelo, por 2 minutos. Em seguida, as células foram transferidas para 800 µL de caldo LB e incubadas a 37 °C, por 1 hora e 30 minutos, sob agitação. Após este período, 100 µL de cada suspensão foram plaqueados em ágar LB suplementado com 2 µg/mL de ceftriaxona e em ágar LB sem antimicrobiano (controle positivo de crescimento). As placas foram mantidas em estufa, a 37 °C, por 18 a 24 horas.

3.13 Análise de tamanho plasmidial

3.13.1 Preparo dos *plugs*

A extração do DNA plasmidial a partir de *plugs* de agarose foi feita de acordo com Dropa (2006).

Os isolados foram cultivados em 30 mL de caldo LB, por 18 a 24 horas, a 37 °C. Após esse tempo, a cultura foi centrifugada a 5.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão TE I (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 1mM, pH 8,0) e transferidas para microtubos de 1,5 mL, os quais foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em 400 µL de tampão TE I e, deste volume, 80 µL foram adicionados a 320 µL de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting*) a 1%, numa temperatura de 55 a 60 °C. Os moldes para a confecção dos plugs foram, então preenchidos e incubados a 4 °C, por 15 minutos, para solidificação.

Após serem retirados dos moldes, os plugs foram inseridos em 5 mL de uma solução de lise (EDTA 50 mM, pH 8,0; Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; SDS 1%, sarkosyl 1%, proteinase K 120 µg/mL), em tubos do tipo Falcon®, e incubados a 55 °C, por 2 horas. Após esse período, os *plugs* foram lavados duas vezes em 10 mL de água miliQ e quatro vezes em 10 mL de TE I, em intervalos de 15 minutos, a 55 °C. Após a última lavagem, os *plugs* foram transferidos

para um microtubo de 1,5 mL, contendo 1 mL de TE I, e mantidos a 4 °C até o momento do uso.

3.13.2 S1-PFGE

A técnica de S1-PFGE foi realizada de acordo Dropa (2012), adaptada de Barton, Harding e Zuccarelli (1995) e Mshana et al. (2009).

A linearização dos plasmídeos foi realizada através da digestão dos *plugs* com a enzima S1 nuclease (Thermo Fisher Scientific Inc, USA). Foram utilizadas 10 U da enzima por plug em um volume de 350 µL do tampão da enzima (fornecido pelo fabricante). A digestão ocorreu durante 45 minutos, a 37 °C, e logo em seguida os *plugs* foram transferidos para um novo microtubo contendo tampão TE I.

Após a digestão, os plugs foram inseridos em um gel de agarose a 1% e submetidos à eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), em solução de tampão TBE 0,5X (Tris-borato 45 mM, EDTA dissódico 1 mM, pH 8,0) com adição de tiouréia 100 mM, utilizando o aparelho Chef Mapper (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). O marcador de peso molecular utilizado foi o Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs, USA). A corrida da eletroforese foi realizada com voltagem de 6 V/cm, com intervalos de pulsos de 1 segundo a 40 segundos, a 14 °C, durante 20 horas.

Por fim, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 1 µg/mL, por 1 hora, e visualizado em luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioimaging Systems). O tamanho plasmidial foi avaliado por comparação com as bandas do marcador de peso molecular.

3.14 Análise dos grupos de incompatibilidade plasmidial

A classificação dos plasmídeos em grupos de incompatibilidade foi feita de acordo com a técnica de tipagem de replicon plasmidial (PBRT – *PCR-Based Replicon Typing*), desenvolvida por Carattoli et al. (2005). Foram realizadas reações simples de PCR para cada um dos 18 grupos de incompatibilidade (A/C, B/O, FIA, FIB, FIC, $FIIA_S$, F_{repB}, HI1, HI2, I1, K, L/M, N, P, T, W, X e Y) descritos por Carattoli et al. (2005), utilizando os iniciadores mostrados na tabela 8. As reações de PCR foram preparadas com DNA plasmidial (para as cepas transconjugantes) ou genômico (para as cepas selvagens), como descrito no item 3.7.

As condições de amplificação e a corrida de eletroforese também foram realizadas conforme descrito neste mesmo item.

Tabela 8 - Iniciadores utilizados para identificação dos grupos de incompatibilidade plasmidial (continua)

Grupo de Incompatibilidade	**Sequência dos iniciadores (5'-3')**	**Sítio alvo**	**Pb***	**T (°C)****
A/C	A/C F: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	repA	465	60
	A/C R: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT			
B/O	K/B F: GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	RNAI	159	60
	B/O R: TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA			
FIA	FIA F: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	iterons	462	60
	FIA R: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG			
FIB	FIB F: GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	repA	702	60
	FIB R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
FIC	FIC F: GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	repA2	262	60
	FIC R: TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT			
$FIIA_S$	$FIIA_S$ F: CTGTCGTAAGCTGATGGC	repA	270	60
	$FIIA_S$ R: CTCTGCCACAAACTTCAGC			
F_{repB}	F_{repB} F: TGATCGTTTAAGGAATTTTG	RNAI/repA	270	52
	F_{repB} R: GAAGATCAGTCACACCATCC			
HI1	HI1 F: GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	parA-parB	471	60
	HI1 R: TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA			
HI2	HI2 F: TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC	iterons	644	60
	HI2 R: GGCTCACTACCGTTGTCATCCT			
I1	I1 F: CGAAAGCCGGACGGCAGAA	RNAI	139	60
	I1 R: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT			
K	K/B F: GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	RNAI	160	60
	K R: TCTTTCACGAGCCCGCCAAA			
L/M	L/M F: GGATGAAAACTATCAGCATCTGAAG	repA,B,C	785	60
	L/M R: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			
N	N F: GTCTAACGAGCTTACCGAAG	repA	559	60
	N R: GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			
P	P F: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	iterons	534	60
	P R: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC			
T	T F: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	repA	750	60
	T R: CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC			

*Pb, pares de bases; **T(^{o}C), temperatura de anelamento em graus Celsius.
Fonte: Carattoli et al., 2005.

Tabela 8 - Iniciadores utilizados para identificação dos grupos de incompatibilidade plasmidial (continuação)

Grupo de Incompatibilidade	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Sítio alvo	Pb*	T (°C)**
W	W F: CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	repA	242	60
	W R: GGTGCGCGGCATAGAACCGT			
X	X F: AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	ori Ƴ	376	60
	X R: TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC			
Y	Y F: AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	repA	765	60
	Y R: GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT			

*Pb, pares de bases; **T(^{o}C), temperatura de anelamento em graus Celsius.
Fonte: Carattoli et al., 2005.

3.15 Sequenciamento de genoma completo

O sequenciamento de genoma completo foi feito para cepas representativas de cada grupo clonal. A extração de DNA genômico foi realizada utilizando o kit PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo (Life Technologies, Carlsbad, CA), de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade e a concentração das amostras de DNA foram, inicialmente, avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1% e por espectrofotometria no aparelho DeNovix DS-11 (DeNovix Inc., Wilmington, USA). Posteriormente, a quantificação e a avaliação da integridade das amostras foram feitas pelo fluorômetro Qubit® 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA), utilizando o kit Qubit® dsDNA HS Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA), conforme recomendações do fabricante. As amostras foram diluídas a uma concentração de 2 ng/µL e armazenadas em geladeira até o momento de preparação das bibliotecas.

As bibliotecas do tipo *paired-end* foram preparadas com o kit Nextera XT DNA Library Preparation (Illumina Inc., Cambridge, UK) de acordo com o protocolo do fabricante (*Nextera® XT DNA Library Prep Reference Guide; Document 15031942 v01*). Esta etapa consiste na fragmentação enzimática do DNA e na ligação de adaptadores aos fragmentos gerados. Após a preparação, a quantificação e a qualidade das bibliotecas foi avaliada pelo sistema Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório de Investigação e Análise de Genomas (*Genome Investigation and Analysis Laboratory - GENIAL*), do Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) da USP, utilizando as plataformas Illumina MiSeq (300 pb) e Illumina NextSeq (75 pb).

Após o sequenciamento, as sequências geradas foram submetidas à montagem *de novo* (sem alinhamento a um genoma de referência) através dos programas de montagem SPAdes versão 3.7.0 e Velvet versão 1.2.10, para as sequências geradas pelas plataformas Illumina MiSeq e Illumina NextSeq, respectivamente. Em seguida, as sequências montadas foram submetidas à anotação automática pela ferramenta *NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP) versão 3.2. As sequências também foram submetidas às ferramentas *online* MLST 1.8, ResFinder 2.1, PlasmidFinder 1.3, SerotypeFinder 1.1 e VirulenceFinder 1.5, para predição de ST, genes de resistência, grupo de incompatibilidade plasmidial, sorotipo e genes de virulência, respectivamente.

Os isolados que foram classificados nos grupos de incompatibilidade plasmidial F ou I1 foram, posteriormente, submetidos à ferramenta *online* pMLST 1.4 para determinação do ST plasmidial. A determinação do pMLST de plasmídeos do IncF é feita através da fórmula FAB (FII, FIA, FIB), onde cada replicon é caracterizado por um tipo de alelo e um número de identificação, como em uma fórmula de sorotipo (CARATTOLI et al., 2014; VILLA et al., 2010). De modo diferente, o pMLST de plasmídeos do tipo IncI1 é determinado pela combinação de alelos dos genes *ardA* (enzima de modificação de restrição do tipo I), *pilL* (biogênese de pilus do tipo IV), *repI1* (replicase), *sogS* (DNA primase) e *trbA* (manutenção e transferência de plasmídeo) (CARATTOLI et al., 2014; GARCIA-FERNANDEZ et al., 2008).

Em casos de isolados que não tiveram grupo de incompatibilidade plasmidial identificado, foi feito um alinhamento da sequência de cada um contra si mesma, pelo programa Geneious v.R9 (Biomatters Ltd, New Zealand), a fim juntar o contig (sequência de DNA obtida pela junção de diversas *reads*) contendo o gene de interesse com outros contigs. A sequência obtida a partir dessa junção foi, então, submetida ao programa BLASTN, que promove o alinhamento de uma sequência de nucleotídeos contra um banco de dados de nucleotídeos. Após a obtenção dos resultados, foram escolhidos os melhores alinhamentos (com maiores porcentagens de identidade e cobertura) e foi verificado se essas sequências pertenciam a plasmídeo ou cromossomo, de modo a definir se o gene em questão está localizado em plasmídeo ou cromossomo.

4 RESULTADOS

Das 36 amostras coletadas dos indivíduos atendidos na CASAI, 19 (52,8%) apresentaram isolados com fenótipo de resistência de interesse no antibiograma. Dentre estas amostras, foram encontrados isolados de diferentes espécies bacterianas, ou até mesmo da mesma espécie, com perfis de resistência distintos, totalizando 29 isolados com perfil fenotípico de interesse. Como perfis fenotípicos de interesse foram encontrados: produção de ESBL (*n* = 4), resistência a quinolonas (*n* = 14), produção de ESBL + resistência a quinolonas (*n* = 10) e resistência a cefalosporinas + carbapenêmico + quinolonas (*n* = 1). Tais isolados foram encontrados em indivíduos de nove etnias (Baniwa, Baré, Hupda, Piratapuya, Tariano, Tukano, Werequino, Yanomami e Yepa-Mahsã), de ambos os sexos, com faixa etária variando de sete meses a 80 anos. Das nove amostras coletadas da equipe técnica, apenas uma (11,1%) apresentou perfil de resistência (resistência a quinolonas; Tabela 9). Dentre as 20 amostras de origem animal, foram encontrados isolados resistentes apenas em cinco cães (25%). Os perfis de resistência de interesse encontrados foram: produção de ESBL (*n* = 3) e produção de ESBL + resistência a quinolonas (*n* = 2; Tabela 10). Não foi observado perfil fenotípico de produção de AmpC em nenhum dos isolados.

Entre os isolados de origem humana, os antimicrobianos que apresentaram as maiores taxas de resistência foram sulfametoxazol/trimetoprim e ciprofloxacina [89,7% (26/29) cada], seguidos por ácido nalidíxico [86,2% (25/29)], gentamicina [62,1% (18/29)], cefotaxima [51,7% (15/29)], ceftriaxona [48,3% (14/29)], amoxacilina/ácido clavulânico [41,4% (12/29)], ceftazidima [34,5% (10/29)] e cefepima [20,7% (6/29)]. Já os isolados de origem animal apresentaram os maiores índices de resistência contra ceftriaxona e cefotaxima [100% (5/5) cada], seguidos por amoxacilina/ácido clavulânico, cefepima, ácido nalidíxico, ciprofloxacina e sulfametoxazol/trimetoprim [60% (3/5) cada]. Nenhum isolado apresentou resistência a fosfomicina (Tabela 11).

Quanto às espécies bacterianas, entre os 30 isolados de origem humana foram encontradas cinco espécies bacterianas diferentes, sendo *E. coli* a mais prevalente (70,0%), seguida por *K. pneumoniae* (16,7%), *Morganella morganii* (6,7%), *Enterobacter kobei* (3,3%) e *Enterobacter asburiae* (3,3%; Tabela 9). Entre os isolados de origem animal, *E. coli* foi a única espécie bacteriana isolada (Tabela 10).

Dentre os 14 isolados de origem humana com perfil fenotípico positivo para ESBL, o gene codificador de ESBL mais prevalente foi $bla_{\text{CTX-M-15}}$ [71,4% (10/14)], seguido por $bla_{\text{CTX-M-14}}$ [21,4% (3/14)] e $bla_{\text{CTX-M-8}}$ [7,1% (1/14)]. O gene bla_{TEM} também foi encontrado

Tabela 9 - Caracterização epidemiológica e fenotípica dos isolados resistentes de indivíduos atendidos e da equipe técnica da CASAI (continua)

ID do Paciente	Sexo	Idade	Etnia	Isolado	Espécie	Perfil de resistência aos antimicrobianos*	Fenótipo de ESBL
BL-I-01	Masculino	1 ano	Tariano	BL-I-01 (1)	*Escherichia coli*	NAL, CIP, GEN, SUT	-
BL-I-05	Feminino	2 anos	Baniwa	BL-I-05 (2)	*Escherichia coli*	CRO, CTX	+
				BL-I-05 (3)	*Klebsiella pneumoniae*	AMC, CAZ, CPM, CRO, CTX, NAL, CIP, GEN, SUT	+
BL-I-09	Feminino	27 anos	Baniwa	BL-I-09 (2)	*Escherichia coli*	CRO, CTX, SUT	+
BL-II-01	Masculino	68 anos	Yepa-Mahsã	BL-II-01 (1)	*Escherichia coli*	NAL, CIP, GEN, SUT	-
BL-II-03	Feminino	43 anos	Piratapuya	BL-II-03 (2)	*Escherichia coli*	NAL, CIP, GEN, SUT	-
BL-II-04	Masculino	47 anos	Hupda	BL-II-04 (1)	*Morganella morganii*	AMC, NAL, CIP, SUT, TIG	-
				BL-II-04 (2)	*Morganella morganii*	AMC, CAZ, CRO, CTX, IPM, NAL, CIP, GEN, SUT	-
				BL-II-04 (3)	*Escherichia coli*	NAL, CIP, GEN, SUT	-
BL-II-05	Masculino	71 anos	Baré	BL-II-05 (2)	*Escherichia coli*	NAL, CIP, SUT	-
BL-II-07	Feminino	47 anos	---	BL-II-07 (1)	*Escherichia coli*	NAL, CIP, GEN, SUT	-
BL-II-10	Feminino	42 anos	Hupda	BL-II-10	*Escherichia coli*	NAL, CIP, GEN, SUT	-
BL-II-11	Masculino	37 anos	Werequino	BL-II-11 (1)	*Escherichia coli*	AMC, CAZ, CPM, CRO, CTX, ETP, NAL, CIP, AMI, GEN, SUT	+
				BL-II-11 (2)	*Klebsiella pneumoniae*	AMC, CAZ, CRO, CTX, NAL, CIP, GEN, SUT	+
				BL-II-11 (3)	*Escherichia coli*	NAL, CIP, SUT	-
BL-II-13	Feminino	16 anos	Hupda	BL-II-13	*Escherichia coli*	CRO, CTX	+
BL-II-14	Feminino	35 anos	Hupda	BL-II-14 (1)	*Enterobacter kobei*	AMC, CRO, CTX, CFO, NAL, CIP, AMI, GEN	+
				BL-II-14 (3)	*Klebsiella pneumoniae*	AMC, CAZ, CPM, CRO, CTX, NAL, CIP, GEN, SUT	+
				BL-II-14 (4)	*Escherichia coli*	NAL, CIP, SUT	

*AMC, amoxacilina/ácido clavulânico; AMI, amicacina; CAZ, ceftazidima; CFO, cefoxitina; CIP, ciprofloxacina; CPM, cefepima; CRO, ceftriaxona; CTX, cefotaxima; ETP, ertapenem; GEN, gentamicina; IPM, imipenem; NAL, ácido nalidíxico; SUT, sulfametoxazol/trimetoprim; TIG, tigeciclina.

Tabela 9 - Caracterização epidemiológica e fenotípica dos isolados resistentes de indivíduos atendidos e da equipe técnica da CASAI (continuação)

ID do Paciente	Sexo	Idade	Etnia	Isolado	Espécie	Perfil de resistência aos antimicrobianos*	Fenótipo de ESBL
BL-II-15	Feminino	1 ano e 8 meses	Hupda	BL-II-15 (1)	*Escherichia coli*	AMC, CAZ, CPM, CRO, CTX, NAL, SUT	+
				BL-II-15 (2)	*Escherichia coli*	NAL, CIP, SUT	-
BL-II-16	Feminino	6 anos	Baré	BL-II-16	*Escherichia coli*	NAL, CIP, GEN, SUT	-
BL-II-17	Feminino	80 anos	Piratapuya	BL-II-17 (1)	*Escherichia coli*	NAL, CIP, GEN, SUT, TIG	-
BL-III-01	Feminino	7 meses	Piratapuya	BL-III-01 (2)	*Escherichia coli*	AMC, CAZ, CPM, CRO, CTX, NAL, CIP, SUT	+
BL-III-02	Feminino	38 anos	Tukano	BL-III-02 (1)	*Klebsiella pneumoniae*	AMC, CAZ, CRO, CTX, NAL, CIP, GEN, SUT	+
				BL-III-02 (2)	*Escherichia coli*	AMC, CAZ, CRO, CTX, NAL, CIP, SUT	+
BL-III-03	Masculino	34 anos	Tariano	BL-III-03 (1)	*Klebsiella pneumoniae*	CRO, CTX, CIP, GEN, SUT	+
				BL-III-03 (2)	*Enterobacter asburiae*	AMC, CAZ, CPM, CRO, CTX, CFO, NAL, CIP, GEN, SUT	+
BL-IV-4	Masculino	26 anos	Yanomami	BL-IV-4	*Escherichia coli*	NAL, CIP, GEN, SUT	-
ET-20	Feminino	30 anos	---	ET-20	*Escherichia coli*	NAL, CIP	-

*AMC, amoxacilina/ácido clavulânico; CAZ, ceftazidima; CFO, cefoxitina; CIP, ciprofloxacina; CPM, cefepima; CRO, ceftriaxona; CTX, cefotaxima; GEN, gentamicina; NAL, ácido nalidíxico; SUT, sulfametoxazol/trimetoprim; TIG, tigeciclina.

Tabela 10 - Caracterização epidemiológica e fenotípica dos isolados resistentes de origem animal

ID do animal	Descrição do animal	Local de coleta	Isolado	Espécie	Perfil de resistência aos antimicrobianos*	Fenótipo de ESBL
03	Cão	CREAM	03	*Escherichia coli*	AMC, CPM, CRO, CTX, NAL, CIP, GEN, SUT	+
05	Cão	HGuSGC	05	*Escherichia coli*	AMC, CRO, CTX,	+
07	Cão	HGuSGC	07	*Escherichia coli*	CPM, CRO, CTX	+
09	Cão	HGuSGC	09	*Escherichia coli*	CPM, CRO, CTX, NAL, CIP, GEN, SUT	+
10	Cão	HGuSGC	10	*Escherichia coli*	AMC, CAZ, CRO, CTX, CFO, NAL, CIP, SUT, TIG	+

*AMC, amoxacilina/ácido clavulânico; CAZ, ceftazidima; CFO, cefoxitina; CIP, ciprofloxacina; CPM, cefepima; CRO, ceftriaxona; CTX, cefotaxima; GEN, gentamicina; NAL, ácido nalidíxico; SUT, sulfametoxazol/trimetoprim; TIG, tigeciclina.

Tabela 11 - Percentual de resistência aos antimicrobianos dos isolados de origem humana e animal, avaliado pela técnica de Kirby-Bauer

Antimicrobiano	**Classe**	**Percentual de Resistência* (nº de isolados/nº total)**	
		Isolados de Humanos	**Isolados de Animais**
Amoxacilina + Ácido Clavulânico (AMC)	β-lactâmico + inibidor	41,4% (12/29)	60% (3/5)
Ceftazidima (CAZ)	Cefalosporina de 3ª geração	34,5% (10/29)	20% (1/5)
Cefepima (CPM)	Cefalosporina de 4ª geração	20,7% (6/29)	60% (3/5)
Ceftriaxona (CRO)	Cefalosporina de 3ª geração	48,3% (14/29)	100% (5/5)
Cefotaxima (CTX)	Cefalosporina de 3ª geração	51,7% (15/29)	100% (5/5)
Cefoxitina (CFO)	Cefamicina	6,9% (2/29)	20% (1/5)
Imipenem (IPM)	Carbapenêmico	3,4% (1/29)	0% (0/5)
Ertapenem (ETP)	Carbapenêmico	3,4% (1/29)	0% (0/5)
Meropenem (MER)	Carbapenêmico	0% (0/29)	0% (0/5)
Ácido Nalidíxico (NAL)	Quinolona de 1ª geração	86,2% (25/29)	60% (3/5)
Ciprofloxacina (CIP)	Fluoroquinolona de 2ª geração	89,7% (26/29)	60% (3/5)
Amicacina (AMI)	Aminoglicosídeo	6,9% (2/29)	0% (0/5)
Gentamicina (GEN)	Aminoglicosídeo	62,1% (18/29)	40% (2/5)
Fosfomicina (FOS)	Fosfomicinas	0% (0/29)	0% (0/5)
Sulfametoxazol + Trimetoprim (SUT)	Sulfonamida	89,7% (26/29)	60% (3/5)
Tigeciclina (TIG)	Glicilciclina	6,9% (2/29)	20% (1/5)

*Percentual de resistência considerando também os isolados com resistência intermediária.

em 11 (78,6%) desses isolados. No isolado que apresentou resistência a cefalosporinas e imipenem, e não teve fenótipo positivo para ESBL, foi detectado o gene *bla*$_{\text{GES-5}}$ (Tabela 12). No que se refere aos cinco isolados de origem animal, o gene mais prevalente foi *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ [60% (3/5)], seguido por *bla*$_{\text{CTX-M-2}}$ e *bla*$_{\text{CTX-M-8}}$ [20% (1/5) cada]. O gene *bla*$_{\text{TEM}}$ foi identificado em dois isolados (40%; Tabela 13).

Em relação aos filogrupos de *E. coli*, os isolados de origem humana foram classificados nos filogrupos D (n = 6) e A (n = 1; Tabela 12), enquanto os isolados de origem humana foram classificados nos filogrupos D (n = 4) e B1 (n = 1; Tabela 13).

A genotipagem dos isolados de *E. coli* por ERIC-PCR permitiu a distinção de seis padrões clonais, dos quais os padrões I (n = 5) e II (n = 3) se destacaram por abranger tanto isolados de origem humana quanto de origem animal (Tabelas 12 e 13; Figura 5). Quanto à genotipagem dos isolados de *K. pneumoniae* por ERIC-PCR, todos os isolados compartilharam o mesmo padrão clonal (Tabela 12; Figura 6).

Tabela 12 - Caracterização genotípica dos isolados de origem humana quanto aos genes de resistência, os filogrupos de *E. coli* e o padrão clonal

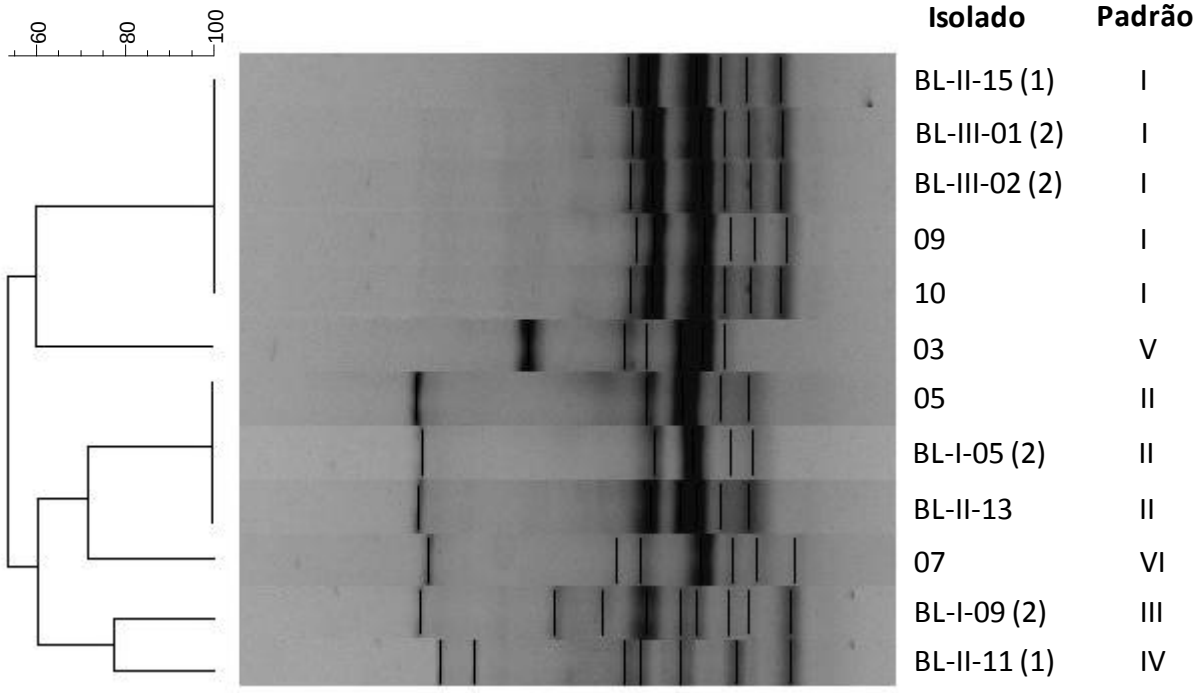
Isolado	Etnia	Espécie	Fenótipo de Resistência	Genótipo de Resistência	Filogrupos de *E. coli*	ERIC-PCR	MLST	
							ST	CC
BL-I-05 (2)	Baniwa	*Escherichia coli*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-14}}$, bla_{TEM}	D	II	6993	---
BL-I-05 (3)	Baniwa	*Klebsiella pneumoniae*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{TEM}		I*	198	198
BL-I-09 (2)	Baniwa	*Escherichia coli*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-14}}$, bla_{TEM}	A	III	10	10
BL-II-04 (2)	Hupda	*Morganella morganii*	Resistência a cefalosporinas e imipenem	$bla_{\text{GES-5}}$			---	---
BL-II-11 (1)	Werequino	*Escherichia coli*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{TEM}	D	IV	648	648
BL-II-11 (2)	Werequino	*Klebsiella pneumoniae*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{TEM}		I*	198	198
BL-II-13	Hupda	*Escherichia coli*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-14}}$, bla_{TEM}	D	II	6993	---
BL-II-14 (1)	Hupda	*Enterobacter kobei*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-8}}$, bla_{TEM}			414	---
BL-II-14 (3)	Hupda	*Klebsiella pneumoniae*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{TEM}		I*	198	198
BL-II-15 (1)	Hupda	*Escherichia coli*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-15}}$	D	I	38	38
BL-III-01 (2)	Piratapuya	*Escherichia coli*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-15}}$	D	I	38	38
BL-III-02 (1)	Tukano	*Klebsiella pneumoniae*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{TEM}		I*	198	198
BL-III-02 (2)	Tukano	*Escherichia coli*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-15}}$	D	I	38	38
BL-III-03 (1)	Tariano	*Klebsiella pneumoniae*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{TEM}		I*	198	198
BL-III-03 (2)	Tariano	*Enterobacter asburiae*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{TEM}			125	---

* Perfil genotípico, por ERIC-PCR, das cepas de *K. pneumoniae*.

Tabela 13 - Caracterização genotípica dos isolados de origem animal quanto aos genes de resistência, os filogrupos de *E. coli* e o padrão clonal

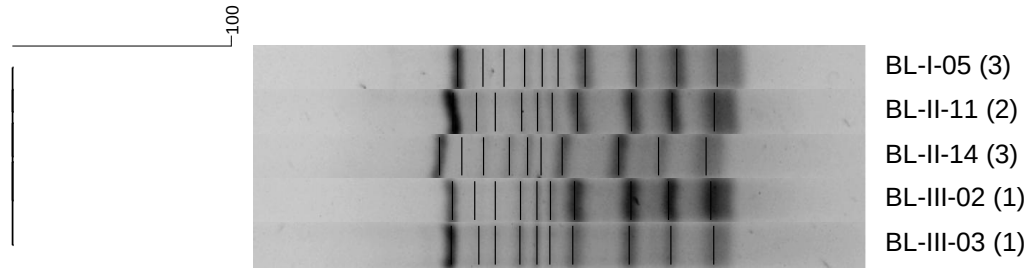
Isolados	Local de coleta	Espécie	Fenótipo de Resistência	Genótipo de Resistência	Filogrupos de *E. coli*	ERIC-PCR	MLST	
							ST	CC
03	CREAM	*Escherichia coli*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-2}}$, bla_{TEM}	D	V	354	354
05	HGuSGC	*Escherichia coli*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-14}}$, bla_{TEM}	D	II	6993	---
07	HGuSGC	*Escherichia coli*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-8}}$	B1	VI	602	446
09	HGuSGC	*Escherichia coli*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-14}}$	D	I	38	38
10	HGuSGC	*Escherichia coli*	ESBL (+)	$bla_{\text{CTX-M-14}}$	D	I	38	38

Figura 5 - Relação clonal dos isolados de *E. coli* de origem humana e animal, pela técnica de ERIC-PCR



Dendrograma construído com o método UPGMA e coeficiente Dice com 0,5% de otimização e 1,5% de tolerância.

Figura 6 - Relação clonal dos isolados de *K. pneumoniae*, pela técnica de ERIC-PCR



Dendrograma construído com o método UPGMA e coeficiente Dice com 0,5% de otimização e 3,4% de tolerância.

A genotipagem por MLST permitiu a identificação de cinco STs distintos entre os 12 isolados de *E. coli*: ST10 (*n* = 1), do complexo clonal 10; ST38 (*n* = 5), do complexo clonal 38; ST354 (*n* = 1), do complexo clonal 354; ST602 (*n* = 1), do complexo clonal 446; e ST648 (*n* = 1), do complexo clonal 648. O ST38 foi identificado tanto em isolados de origem humana quanto em isolados de origem animal. Já os STs 354 e 602 foram identificados exclusivamente nos isolados de cães. Dois isolados de origem humana e um isolado de origem animal foram classificados em um novo ST (ST6993), como resultado da combinação entre o novo alelo *adk*595 e os alelos *fumC*35, *gyrB*390, *icd*6, *mdh*5, *purA*16 e *recA*91. Adicionalmente, os isolados de *E. kobei* e *E. asburiae* foram identificados como ST414 e

ST125, respectivamente, enquanto os cinco isolados de *K. pneumoniae* foram identificados como ST198. Entre os isolados de origem humana, ainda foi possível observar a presença de isolados de um mesmo ST em indivíduos de etnias diferentes, como no caso dos isolados de *E. coli* do ST6993, que foram detectados em indivíduos das etnias Baniwa e Hupda, e do ST38, que foram detectados em indivíduos das etnias Hupda, Piratapuya e Tukano. Os isolados de *K. pneumoniae*, todos pertencentes ao ST198, foram detectados em indivíduos de cinco etnias diferentes (Baniwa, Hupda, Tariano, Tukano e Werequino; Tabelas 12 e 13).

A mobilização dos genes de resistência foi possível somente pela técnica de conjugação e, em apenas, nove isolados (sete de origem humana e um de origem animal). No antibiograma, quatro cepas transconjugantes apresentaram resistência apenas a cefalosporinas, quatro apresentaram resistência a cefalosporinas, quinolonas e aminoglicosídeos e uma apresentou resistência a cefalosporinas e aminoglicosídeo. Os genes codificadores de ESBL mobilizados foram $bla_{\text{CTX-M-14}}$ (n = 4), $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (n = 3) e $bla_{\text{CTX-M-8}}$ (n = 2; Tabela 14).

Entre os isolados de origem humana, o grupo de incompatibilidade plasmidial mais encontrado foi o da família IncF (n = 10), tanto nas cepas transconjugantes quanto nas selvagens. Todos os plasmídeos deste grupo foram detectados em cepas carregando o gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$. O IncI1 foi encontrado em três isolados carregando o gene $bla_{\text{CTX-M-14}}$, enquanto o IncL/M foi encontrado em um isolado carregando o gene $bla_{\text{CTX-M-8}}$. Em um isolado de *M. morganii*, carregando o gene $bla_{\text{GES-5}}$, não foi possível detectar nenhum dos grupos de incompatibilidade plasmidial testados (Tabela 14).

Entre os isolados de origem animal, foram detectados plasmídeos dos grupos IncI1 (n = 2) e IncF (n = 1). O IncF foi detectado em um isolado carregando o gene $bla_{\text{CTX-M-2}}$, enquanto o IncI1 foi detectado em um isolado carregando o gene $bla_{\text{CTX-M-8}}$ e em outro isolado carregando o gene $bla_{\text{CTX-M-14}}$. Em contrapartida, outros dois isolados carregando o gene $bla_{\text{CTX-M-14}}$ não tiveram nenhum grupo de incompatibilidade plasmidial detectado (Tabela 14).

O tamanho dos plasmídeos variou de 48,5 a 291 kb, sendo que não foi observada a presença de plasmídeos no isolado de *M. morganii* e nos dois isolados de *E. coli* de animal, que não tiveram grupo de incompatibilidade plasmidial detectado. Todos os plasmídeos do grupo IncI1 apresentaram o mesmo tamanho (≈ 97 kb). O plasmídeo do grupo IncL/M também apresento tamanho de ≈ 97 kb. Quanto aos três plasmídeos do grupo IncF, das cepas transconjugantes, dois apresentaram tamanho de ≈ 291 kb e um apresentou tamanho de ≈ 194 kb (Tabela 14).

Tabela 14 - Caracterização dos plasmídeos dos isolados de origem humana e animal quanto à mobilização, aos grupos de incompatibilidade e ao tamanho plasmidial

Isolado	Espécie	Genes de resistência	Mobilização plasmidial	Fenótipo de resistência das transconjugantes	Grupos Inc	Tamanho plasmidial (≈ kb)
BL-I-05 (2)	*E. coli*	$bla_{\text{CTX-M-14}}$, bla_{TEM}	Conjugação	CRO, CTX	I1	97
BL-I-05 (3)	*K. pneumoniae*	$bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{TEM}	Não mobilizado	---	FII, FIB	48,5 / 97 / 194
BL-I-09 (2)	*E. coli*	$bla_{\text{CTX-M-14}}$, bla_{TEM}	Conjugação	CRO, CTX	I1	97
BL-II-04 (2)	*M. morganii*	$bla_{\text{GES-5}}$	Não mobilizado	---	NT	Não possui
BL-II-11 (1)	*E. coli*	$bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{TEM}	Não mobilizado	---	FII, FIA, FIB	70 / 97 / 145,5
BL-II-11 (2)	*K. pneumoniae*	$bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{TEM}	Não mobilizado	---	FII, FIB	97 / 194
BL-II-13	*E. coli*	$bla_{\text{CTX-M-14}}$, bla_{TEM}	Conjugação	CRO, CTX	I1	97
BL-II-14 (1)	*E. kobei*	$bla_{\text{CTX-M-8}}$, bla_{TEM}	Conjugação	CRO, CTX, NAL, CIP, AMI, EST, TOB	L/M	97
BL-II-14 (3)	*K. pneumoniae*	$bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{TEM}	Não mobilizado	---	FII, FIB	97
BL-II-15 (1)	*E. coli*	$bla_{\text{CTX-M-15}}$	Conjugação	CAZ, CRO, CTX, NAL, EST, TOB, TET	FII, FIA	194
BL-III-01 (2)	*E. coli*	$bla_{\text{CTX-M-15}}$	Conjugação	CAZ, CRO, CTX, CPM, NAL, CIP, EST, TOB, TET	FIA, FIB	291
BL-III-02 (1)	*K. pneumoniae*	$bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{TEM}	Não mobilizado	---	FII, FIB	291
BL-III-02 (2)	*E. coli*	$bla_{\text{CTX-M-15}}$	Conjugação	CAZ, CRO, CTX, NAL, CIP, EST, TOB, TET	FIA, FIB	291
BL-III-03 (1)	*K. pneumoniae*	$bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{TEM}	Não mobilizado	---	FII, FIB	291
BL-III-03 (2)	*E. asburiae*	$bla_{\text{CTX-M-15}}$, bla_{TEM}	Não mobilizado	---	FII, FIB	97 / 291
03	*E. coli*	$bla_{\text{CTX-M-2}}$, bla_{TEM}	Não mobilizado	---	FIA, FIB	97
05	*E. coli*	$bla_{\text{CTX-M-14}}$, bla_{TEM}	Conjugação	CRO, CTX	I1	97
07	*E. coli*	$bla_{\text{CTX-M-8}}$	Conjugação	CRO, CTX, EST	I1	97
09	*E. coli*	$bla_{\text{CTX-M-14}}$	Não mobilizado	---	NT	Não possui
10	*E. coli*	$bla_{\text{CTX-M-14}}$	Não mobilizado	---	NT	Não possui

AMI, amicacina; CAZ, ceftazidima; CIP, ciprofloxacina; CPM, cefepima; CRO, ceftriaxona; CTX, cefotaxima; EST, estreptomicina; NAL, ácido nalidíxico; TET, tetraciclina; TOB, tobramicina.

Os resultados obtidos pelo sequenciamento de genoma completo confirmaram a identificação dos genes de resistência, previamente detectados por PCR e sequenciamento de Sanger, e dos grupos de incompatibilidade plasmidial, previamente detectados pela técnica de PBRT. Adicionalmente, foram identificados outros genes de resistência a antimicrobianos β-lactâmicos (*bla*$_{DHA-1}$, *bla*$_{OXA-1}$, *bla*$_{OXA-9}$ e *bla*$_{SHV-11}$), além de genes de resistência a aminoglicosídeos [*aac(3)-IIa*, *aac(3)-IId*, *aacA4*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aph(3')-Ia*, *strA* e *strB*], quinolonas [*aac(6')Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrB1* e *qnrB66*], sulfametoxazol (*sul1* e *sul2*), trimetoprim (*dfrA12*, *dfrA14*, *dfrA15* e *dfrA17*), tetraciclinas (*tetA* e *tetB*), fosfomicina (*fosA*), fenicóis (*catA1*, *catA2*, *catB3* e *cmlA1*) e macrolídeos, lincosamida e estreptogramina B [*erm(B)*, *mph(A)*, *mph(E)* e *msr(E)*] (Tabela 15).

Através da ferramenta PlasmidFinder 1.3, além dos grupos de incompatibilidade plasmidial previamente identificados pela técnica de PBRT, foram identificados outros grupos, como Col156, Col (BS512), HI2, HI2A, I2, p0111 e Q1. Assim como na técnica de PBRT, não foi identificado nenhum grupo de incompatibilidade plasmidial no isolado de *M. morganii* (carregando o gene *bla*$_{GES-5}$) e em dois isolados de *E. coli* (carregando o gene *bla*$_{CTX-M-14}$; Tabela 15). As análises realizadas através da ferramenta BLASTN confirmaram a localização plasmidial destes genes nos três isolados.

Referente ao pMLST, os plasmídeos da família IncF foram classificados nos replicons F31:A4:B10, F1:A6:B20 e em mais quatro prováveis novos replicons [ND (F31:A4:B-), ND (F-:A1:B1), ND (K7:A-:B-) e ND (Y3:A-:B-)] (Tabela 15). Nestes, um ou dois alelos não alinharam perfeitamente com alelos previamente registrados no banco de dados do pMLST, indicando se tratar de novos replicons. Para diferenciá-los, foi colocada a sigla ND (não determinado) no início da fórmula e os alelos que não alinharam perfeitamente receberam um sinal negativo (-). Os três plasmídeos do IncI1 carregando o gene *bla*$_{CTX-M-14}$ foram classificados no mesmo ST (ST80), enquanto o plasmídeo de IncI1 carregando o gene *bla*$_{CTX-M-8}$ foi classificado no ST131 (Tabela 15).

Quanto aos sorotipos de *E. coli*, foram identificados sete sorotipos diferentes: O86:H18 (*n* = 2), ONT:H18 (*n* = 2), ONT:H20 (*n* = 2), O12:H4 (*n* = 1), ONT:H6 (*n* = 1), O51:H34 (*n* = 1) e ONT:H21 (*n* = 1). Os sorotipos O12:H4 e ONT:H6 só foram detectados em isolados de humanos, enquanto os sorotipos O51:H34 e ONT:H21 foram detectados exclusivamente nos isolados de animais. Já os isolados de *K. pneumoniae* foram classificados no sorotipo K30 (Tabela 15).

Em relação à virulência de *E. coli*, foram encontrados os seguintes genes: *air* (codifica proteína de repetição de imunoglobulina enteroagregativa), *astA* (codifica toxina termo-

estável EAST-1), *eilA* (relacionado a aderência e formação de biofilme), *gad* (codifica glutamato descarboxilase), *iroN* (codifica proteína receptora de sideróforo), *iss* (relacionado ao aumento de sobrevivência no soro), *lpfa* (relacionado à formação de fímbrias polares longas), *mchF* (codifica uma proteína transportadora do sistema ABC), *nfaE* (codifica uma adesina fibrilar de aderência difusa), *sat* (codifica uma proteína transportadora segregada) e *senB* (gene plasmidial que codifica uma enterotoxina; Tabela 15).

No caso dos isolados de *K. pneumoniae*, os genes de virulência detectados foram os genes *fyuA* (codifica receptor do sideróforo yersiniabactina), *irp2* (envolvido na síntese de yersiniabactina) e genes do operon *mrk* (responsável por codificar fímbrias do tipo 3, relacionadas à formação de biofilme) e do operon *ybt* (responsável pela síntese de yersiniabactina; Tabela 15).

Tabela 15 - Caracterização genotípica de isolados representativos de diferentes grupos clonais, pela técnica de sequenciamento de genoma completo (continua)

Isolado	**Espécie**	**Fonte**	**Sequenciamento de genoma completo**						
			Sorotipo	**MLST**		**Genes de resistência**	**Inc***	**pMLST**	**Genes de virulência**
				ST	**CC**				
BL-II-15 (1)	*E. coli*	Humano	ONT:H18	38	38	*bla*$_{CTX-M-15}$, *aac(6')Ib-cr*, *tetB*, *dfrA17*	FII, FIA, Col156	ND (F31:A4:B-)	*air*, *nfaE*, *senB*
BL-III-02 (2)	*E. coli*	Humano	O86:H18	38	38	*bla*$_{CTX-M-15}$, *bla*$_{OXA-1}$, *aadA5*, *aac(6')Ib-cr*, *mph(A)*, *catB3*, *sul1*, *tetB*, *dfrA17*	FII, FIA, FIB, Col156	F31:A4:B10	*air*, *eilA*, *gad*, *nfaE*, *senB*
09	*E. coli*	Animal	O86:H18	38	38	*bla*$_{CTX-M-14}$, *aadA2*, *aac(3)-IIa*, *mph(A)*, *erm(B)*, *sul1*, *dfrA12*	NI	---	*air*, *eilA*, *gad*, *iss*
10	*E. coli*	Animal	ONT:H18	38	38	*bla*$_{CTX-M-14}$, *aadA2*, *mph(A)*, *erm(B)*, *sul1*, *dfrA12*	NI	---	*air*, *eilA*, *iss*
BL-II-13	*E. coli*	Humano	ONT:H20	6993	---	*bla*$_{CTX-M-14}$, *bla*$_{TEM-1B}$, *erm(B)*	I1	ST80	*eilA*, *gad*, *lpfA*
05	*E. coli*	Animal	ONT:H20	6993	---	*bla*$_{CTX-M-14}$, *bla*$_{TEM-1B}$, *erm(B)*	I1	ST80	*air*, *eilA*, *lpfA*
BL-I-09 (2)	*E. coli*	Humano	O12:H4	10	10	*bla*$_{CTX-M-14}$, *bla*$_{TEM-1B}$, *aadA2*, *erm(B)*, *cmlA1*, *sul1*, *tetB*, *dfrA15*	I1	ST80	*gad*, *iha*, *iss*, *sat*
BL-II-11 (1)	*E. coli*	Humano	ONT:H6	648	648	*bla*$_{CTX-M-15}$, *bla*$_{TEM-1B}$, *bla*$_{OXA-1}$, *aac(3)-Iia*, *aac(6')Ib-cr*, *aadA5*, *erm(B)*, *mph(A)*, *catB3*, *sul1*, *dfrA17*	FII, FIA, FIB, I2, Col (BS512)	F1:A6:B20	*air*, *eilA*, *gad*, *lpfA*, *sat*, *senB*

*NI, não identificado.

Tabela 15 - Caracterização genotípica de isolados representativos de diferentes grupos clonais, pela técnica de sequenciamento de genoma completo (continua)

			Sequenciamento de genoma completo						
				MLST					
Isolado	**Espécie**	**Fonte**	**Sorotipo**	**ST**	**CC**	**Genes de resistência**	**Inc**	**pMLST**	**Genes de virulência**
03	*E. coli*	Animal	O51:H34	354	354	*bla*$_{\text{CTX-M-2}}$, *bla*$_{\text{TEM-1B}}$, *aac(3)-IId*, *aadA1*, *aph(3')-Ia*, *strA*, *strB*, *catA1*, *sul1*, *sul2*, *tetB*, *dfrA17*	FIA, FIB, p0111, Q1,	ND (F-:A1:B1)	*air*, *astA*, *eilA*, *lpfA*,
07	*E. coli*	Animal	ONT:H21	602	446	*bla*$_{\text{CTX-M-8}}$, *strA*, *strB*, *tetB*	I1	131	*gad*, *iroN*, *iss*, *lpfA*, *mchF*
BL-I-05 (3)	*K. pneumoniae*	Humano	K30	198	198	*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, *bla*$_{\text{TEM-1B}}$, *bla*$_{SHV-11}$, *aac(3)-IIa*, *strA*, *aac(6')Ib-cr*, *oqxA*, *fosA*, *catA1*, *sul2*, *tetA*	FII, FIB	ND (K7:A-:B-)	*fyuA*, *irp2*, *mrkA*, *mrkB*, *mrkI*, *ybtA*, *ybtQ*, *ybtT*, *ybtU*, *ybtX*
BL-III-02 (1)	*K. pneumoniae*	Humano	K30	198	198	*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, *bla*$_{\text{TEM-1B}}$, *bla*$_{SHV-11}$, *bla*$_{\text{OXA-1}}$, *aac(6')Ib-cr*, *aac(3)-IIa*, *strA*, *strB*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrB66*, *fosA*, *catB3*, *catA1*, *sul2*, *tetA*, *dfrA14*	FII, FIB	ND (K7:A-:B-)	*fyuA*, *irp2*, *mrkA*, *mrkB*, *mrkH*, *mrkI*, *ybtA*, *ybtP*, *ybtQ*, *ybtS*, *ybtT*, *ybtU*, *ybtX*
BL-III-03 (1)	*K. pneumoniae*	Humano	K30	198	198	*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, *bla*$_{\text{TEM-1B}}$, *bla*$_{SHV-11}$, *bla*$_{\text{OXA-1}}$, *aac(6')Ib-cr*, *aac(3)-IIa*, *strA*, *strB*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrB66*, *fosA*, *catB3*, *catA1*, *sul2*, *tetA*, *dfrA14*	FII, FIB	ND (K7:A-:B-)	*fyuA*, *irp2*, *mrkA*, *mrkB*, *mrkH*, *mrkI*, *ybtA*, *ybtP*, *ybtQ*, *ybtS*, *ybtT*, *ybtU*, *ybtX*

Tabela 15 - Caracterização genotípica de isolados representativos de diferentes grupos clonais, pela técnica de sequenciamento de genoma completo (continuação)

			Sequenciamento de genoma completo						
				MLST					
Isolado	**Espécie**	**Fonte**	**Sorotipo**	**ST**	**CC**	**Genes de resistência**	**Inc***	**pMLST**	**Genes de virulência**
BL-II-14 (1)	*E. kobei*	Humano	---	414	---	*bla*$_{\text{CTX-M-8}}$, *bla*$_{\text{TEM-1A}}$, *bla*$_{\text{OXA-9}}$, *aac(6')-Ib*, *aadA1*, *aac(6')Ib-cr*, *fosA*	L/M	---	---
BL-III-03 (2)	*E. asburiae*	Humano	---	125	---	*bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, *bla*$_{\text{TEM-1B}}$, *bla*$_{\text{OXA-1}}$, *aac(6')Ib-cr*, *strA*, *strB*, *aac(3)-IIa*, *aadA1*, *qnrB1*, *fosA*, *catB3*, *catA1*, *sul2*, *tetA*, *dfrA14*	FII, FIB, HI2, HI2A	ND (Y3:A-:B-)	---
BL-II-04 (2)	*M. morganii*	Humano	---	---	---	*bla*$_{\text{GES-5}}$, *bla*$_{\text{OXA-1}}$, *bla*$_{\text{DHA-1}}$, *aadA2*, *aacA4*, *aac(6')Ib-cr*, *mph(E)*, *msr(E)*, *catB3*, *catA2*, *sul1*, *tetB*, *dfrA15*	NI	---	---

*NI, não identificado.

5 DISCUSSÃO

A disseminação de bactérias produtoras de β-lactamases adquiridas, principalmente na comunidade, é um assunto de grande interesse e importância para a saúde pública, visto a facilidade de mobilização dos genes relacionados (*bla*) por transferência horizontal e/ou vertical, principalmente por plasmídeos altamente promíscuos, do ponto de vista genético. Indivíduos e animais saudáveis podem ser portadores de bactérias resistentes, principalmente na microbiota intestinal, atuando como reservatórios e veículos de disseminação dentro da comunidade (LI et al., 2011; NICOLAS-CHANOINE et al., 2013). Recentemente, grande atenção tem sido dada ao tráfego de indivíduos que visitam países com características de endemicidade para genótipos de resistência, principalmente para ESBLs do tipo CTX-M e para metalo-beta-lactamases do tipo NDM-1 (ARYA; AGARWAL, 2011; ÖSTHOLM-BALKHED et al., 2013; VON WINTERSDORFF et al., 2014).

Dentre os perfis de resistência encontrados nas comunidades, a produção de ESBLs é o principal, sendo que CTX-M é a enzima predominantemente encontrada, sobretudo a variante CTX-M-15 (WOERTHER et al., 2013a). Entretanto, enzimas do tipo TEM e SHV também são frequentemente reportadas em isolados provenientes da comunidade (MACHADO et al., 2013; MINARINI et al., 2007; WOERTHER et al., 2010).

Tendo em vista que a pressão seletiva por uso de antimicrobianos é considerada o principal fator responsável pelo surgimento e manutenção de bactérias resistentes tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade, poucos estudos são realizados em comunidades remotas com baixa exposição a antimicrobianos. Contudo, alguns trabalhos têm demonstrado que mesmo essas comunidades podem ser atingidas pelo problema da resistência antimicrobiana, ainda que por mecanismos não elucidados (BARTOLONI et al., 2004, 2009; PALLECCHI et al., 2007; WOERTHER et al., 2010, 2013b).

Em relação ao presente estudo, a constatação de indivíduos de uma região remota colonizados por bactérias multi-resistentes suscitou a preocupação quanto à disseminação dessas bactérias no ambiente comunitário. Um alto índice de resistência foi encontrado na população de estudo, de modo semelhante ao que foi descrito previamente em comunidades remotas na Bolívia (BARTOLONI et al., 2004), na

Amazônia peruana (BARTOLONI et al., 2009), no Senegal (RUPPÉ et al., 2009) e na Guiana Francesa (GRENET et al., 2004; WOERTHER et al., 2010, 2013b).

Escherichia coli foi a espécie predominantemente encontrada entre os isolados, o que pode ser justificado pelo fato de ser integrante da microbiota comensal do intestino (PENDERS et al., 2013; TENAILLON et al., 2010). A segunda espécie mais encontrada foi *K. pneumoniae*, a qual também é frequentemente relacionada à dispersão de resistência a antimicrobianos na comunidade (GRENET et al., 2004; ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016; WOERTHER et al., 2010; WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011).

Dentre os mecanismos de resistência encontrados, destaca-se a produção de ESBL do tipo CTX-M, que é considerado um dos mais importantes mecanismos de resistência nos dias atuais (D'ANDREA et al., 2013; LAHLAOUI; BEN HAJ KHALIFA; BEN MOUSSA, 2014). A associação entre produção de CTX-M e resistência a outros β-lactâmicos, bem como antimicrobianos de outras classes, especialmente quinolonas e aminoglicosídeos, também foi encontrada na maioria dos isolados. Este é um fenótipo comum entre isolados multi-resistentes e, geralmente, ocorre devido ao carregamento dos genes codificadores de β-lactamases associados a outros genes de resistência em um mesmo plasmídeo (ANSSOUR et al., 2014; ZURFLUH et al., 2014).

A predominância das variantes CTX-M-15 e CTX-M-14 reflete o padrão epidemiológico mundial, em que estas são as variantes mais descritas em humanos, animais e ambiente (LAHLAOUI; BEN HAJ KHALIFA; BEN MOUSSA, 2014). As demais variantes encontradas (CTX-M-2 e CTX-M-8) estão entre as variantes mais reportadas em isolados clínicos no Brasil e na América Latina (KAZMIERCZAK et al., 2015; ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016; SAMPAIO; GALES, 2016). Entretanto, no presente estudo, foi detectada a presença de CTX-M-2 e CTX-M-8 em isolados de cães, as quais são variantes que não têm sido reportadas em animais de companhia (RUBIN; PITOUT, 2014).

Adicionalmente, a detecção da carbapenemase GES-5 representou um surpreendente achado neste trabalho, consistindo na primeira descrição dessa enzima em um isolado de *M. morganii*, no mundo. Além disso, no Brasil, a enzima GES-5 só foi descrita em isolados clínicos ou de ambiente hospitalar, nos estados do Maranhão (DA FONSECA et al., 2007), São Paulo (FEHLBERG et al., 2012; PICÃO et al., 2010; PICÃO et al., 2009; POLOTTO et al., 2012; RIZEK et al., 2014; XAVIER et al., 2010)

e Rio Grande do Sul (RIBEIRO et al., 2014a, 2014b), com exceção de um isolado ambiental no estado do Rio de Janeiro (MONTEZZI et al., 2015).

A mobilização de plasmídeos de resistência por conjugação, observada neste estudo, embora em menos da metade dos isolados, evidencia a facilidade de disseminação desses genes de resistência na comunidade (KOTTARA et al., 2016). O perfil fenotípico de resistência a cefalosporinas associado a resistência a outras classes de antimicrobianos, como quinolonas, aminoglicosídeos e/ou tetraciclinas, apresentado por parte das cepas transconjugantes, indica a presença mútua de genes codificadores de ESBLs e de resistência a quinolonas, aminoglicosídeos e/ou tetraciclinas em um mesmo plasmídeo, o que é considerado uma característica comum de plasmídeos carregadores de ESBL (CAN et al., 2015; CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012; LIU et al., 2013; ZURFLUH et al., 2014). Os genes $bla_{\text{CTX-M-15}}$ e $bla_{\text{CTX-M-14}}$ estão entre os genes que foram mobilizados por conjugação e também foram os genes mais prevalentes no estudo. Dessa forma, pode-se inferir que o fato desses plasmídeos serem conjugativos facilitou a sua dispersão na comunidade e contribuiu para que tais genes fossem os mais prevalentes.

Os outros dois genes $bla_{\text{CTX-M-14}}$, presentes em isolados de cães, tiveram sua localização confirmada no cromossomo. Da mesma forma, o gene $bla_{\text{GES-5}}$, do isolado de *M. morganii*, também foi localizado no cromossomo. Apesar de serem comumente associados com plasmídeos, a localização cromossomal dos genes $bla_{\text{CTX-M-14}}$ e $bla_{\text{GES-5}}$ tem sido descrita em alguns estudos. O gene $bla_{\text{CTX-M-14}}$ já teve sua localização cromossomal confirmada em isolados clínicos de *Proteus mirabilis* e de *E. coli*, na Coréia (KIM et al., 2011b; SONG et al., 2011), bem como em isolados clínicos de *E. coli*, na Holanda e na Inglaterra (RODRÍGUEZ et al., 2014) e no Japão (HAMAMOTO et al., 2016). Recentemente, isolados de *E. coli* apresentando o gene $bla_{\text{CTX-M-14}}$ cromossomal foram reportados em amostras de swab cloacal de aves selvagens, no deserto de Gobi, na região sul da Mongólia (GUENTHER et al., 2017). Coincidentemente, os isolados clínicos da Holanda e da Inglaterra e os isolados de aves migratórias da Mongólia foram classificados no ST38 (RODRÍGUEZ et al., 2014; GUENTHER et al., 2017), assim como os dois isolados portadores de $bla_{\text{CTX-M-14}}$ cromossomal encontrados neste estudo. Já a presença de $bla_{\text{GES-5}}$ em cromossomo foi descrita em isolados clínicos de *P. aeruginosa* na cidade de São Paulo (PICÃO et al., 2009) e na Espanha (VIEDMA et al., 2009), e em isolados clínicos de *E. coli*, na Coréia (KIM et al., 2011a). Apesar de não ser um fenômeno bem elucidado, acredita-se que a

localização cromossomal de genes frequentemente encontrados em plasmídeos indique um processo evolutivo, visando à manutenção desses genes na população (RODRÍGUEZ et al., 2014).

Quanto aos demais genes, o fato de não terem sido transferidos nem por conjugação, nem por transformação, não dá respaldo suficiente para afirmar sua localização cromossomal. A não mobilização pela técnica de conjugação pode indicar que esses plasmídeos não apresentam todo o conjunto de genes necessários para que ocorra esse processo (FRANCIA et al., 2004; SMILLIE et al., 2010). Já em relação à transformação, é possível que tenha ocorrido falha em relação à própria técnica. Apesar dos ensaios de transformação terem sido realizados por dois métodos diferentes, foi testado apenas um protocolo para cada método. Além disso, em ambos os métodos, foi utilizada uma única linhagem de célula competente (*E. coli* DH5α).

Os grupos de incompatibilidade plasmidial encontrados (IncF, IncI1 e IncL/M) estão entre os grupos considerados epidêmicos, visto que são comumente reportados em diferentes gêneros bacterianos, provenientes de diferentes fontes e de diversas regiões do mundo (CARATTOLI, 2009, 2013). Este fato ressalta o importante papel desses plasmídeos como transmissores de genes de resistência dentro da comunidade. O grupo predominante foi o da família IncF, encontrado majoritariamente em isolados carregando o gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$. Além disso, nestes isolados foi encontrada a associação entre o gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$ e genes como $bla_{\text{TEM-1B}}$, $bla_{\text{OXA-1}}$ e *aac(6')Ib-cr*. Esta é uma característica comum de plasmídeos da família IncF e a presença de múltiplos genes de resistência em um mesmo plasmídeo é motivo de grande preocupação (CARATTOLI et al., 2008; RAFAÏ et al., 2015; VILLA et al., 2010). Por outro lado, o segundo gene mais encontrado no trabalho ($bla_{\text{CTX-M-14}}$) esteve relacionado ao IncI1, também em concordância com dados apresentados na literatura (CURIAO et al., 2011; GARCIA-FERNANDEZ et al., 2008; LIAO et al., 2015). Adicionalmente, o grupo IncI1 foi associado ao gene $bla_{\text{CTX-M-8}}$, em um isolado de cão. Plasmídeos do grupo IncI1 carregando o gene $bla_{\text{CTX-M-8}}$ têm sido reportados em diferentes países, inclusive no Brasil, principalmente em isolados de *E. coli* e *Salmonella enterica* de amostras de origem humana, animal e ambiental (BÖRJESSON et al., 2016; DROPA et al., 2016; ELLER et al., 2014; FERREIRA et al., 2016).

A análise filogenética dos isolados de *E. coli* demonstrou que a maioria pertence ao filogrupo D, o qual está associado a cepas virulentas extra-intestinais (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). Este resultado se diferencia de resultados obtidos por

outros estudos realizados em comunidades remotas, onde os filogrupos comensais A e B1 foram os mais encontrados (BARTOLONI et al., 2009; RUPPÉ et al., 2009; WOERTHER et al., 2010, 2013b). Apesar desse tipo de cepas estar associado a casos de infecção, estudos anteriores já evidenciaram que elas podem estar presentes na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis (CHATTAWAY et al., 2014; ERJAVEC; ŽGUR-BERTOK, 2015). Além do filogrupo D, também foram encontrados os filogrupos A e B1 que caracterizam isolados comensais (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000).

Os dados gerados por ERIC-PCR evidenciaram uma diversidade genética entre os isolados de *E. coli*. Entretanto, também foi possível observar a presença de isolados clonalmente relacionadas entre humanos, entre animais e entre humanos e animais. Quanto aos isolados de *K. pneumoniae*, a identificação de um único padrão clonal indica o predomínio e a circulação de um mesmo clone na comunidade.

A análise clonal por MLST corrobora os dados obtidos pela técnica de ERIC-PCR. O ST38 foi o principal ST encontrado neste estudo, sendo identificado tanto em isolados de humanos quanto em isolados de animais, evidenciando sua capacidade de disseminação e adaptação em diferentes hospedeiros. De acordo com os dados disponíveis no banco de dados de MLST de *E. coli* (http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/GetTableInfo_html), este é um ST mundialmente disseminado e prevalente em isolados de origem humana. No presente estudo, este ST esteve associado ao gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$, nos isolados de humanos, e ao gene $bla_{\text{CTX-M-14}}$, nos isolados de animais. O ST38 é considerado um dos principais STs responsáveis pela disseminação do gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (ALGHORIBI et al., 2015; CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012; GUIRAL et al., 2011) e também tem sido frequentemente descrito em isolados carregando o gene $bla_{\text{CTX-M-14}}$ (KIM et al., 2016; MÜLLER; STEPHAN; NÜESCH-INDERBINEN, 2016; PENG; ZONG, 2011).

Adicionalmente, os STs 10 e 648, encontrados em isolados de humanos, e os STs 354 e 602, de origem animal, são STs com reconhecido potencial zoonótico (CAO et al., 2014; COQUE et al., 2008; DAY et al., 2016; GIUFRÈ et al., 2012; GUO et al., 2015; HASAN et al., 2016). O novo ST encontrado (ST6993) não foi agrupado em nenhum complexo clonal previamente descrito, mostrando ser um clone distinto. Por outro lado, este ST foi encontrado em dois isolados de humanos e em um isolado de cão, evidenciando sua capacidade de se adaptar a diferentes hospedeiros.

Adicionalmente, os três isolados pertencentes ao ST6993, foram classificados no filogrupo D, o que pode caracterizá-lo como um clone com potencial invasivo.

Foi, também, encontrada associação entre os demais STs e os filogrupos, corroborando dados previamente reportados na literatura. Os STs 38, 354 e 648 estão associados ao filogrupo D (COQUE et al., 2008; HARADA; NAKAI; KATAOKA, 2012; MÜLLER; STEPHAN, NÜESCH-INDERBINEN, 2016), assim como o ST 602 está associados ao filogrupo B1 (GIUFRÈ et al., 2012), e o ST10 está associado ao filogrupo A (RODRIGUES; MACHADO; NOVAIS, 2013).

Os isolados de *K. pneumoniae* foram representados por um único ST (ST198), o qual foi anteriormente descrito em dois isolados comensais de humanos, no Rio de Janeiro, e em isolados comensais de macaco e de bovino, nos Estados Unidos (http://bigsdb.pasteur.fr/perl/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_klebsiella_isolates_public&page=query). Quanto aos isolados de *E. asburiae* e *E. cloacae*, não foram encontrados dados epidemiológicos referentes aos seus respectivos STs (ST125 e ST414).

Os resultados obtidos pelo sequenciamento de genoma completo permitiram uma melhor caracterização dos isolados, como o fornecimento de dados adicionais acerca do perfil genotípico de resistência. A maioria do isolados apresentou genes de resistência a três ou mais classes de antimicrobianos, o que os caracteriza como isolados multi-resistentes (MAGIORAKOS et al., 2012). Entretanto, alguns isolados apresentaram fenótipo de resistência a determinados antimicrobianos – como sulfametoxazol/trimetoprim, ácido nalidíxico e ciprofloxacina – e os respectivos genes de resistência não foram detectados pelo sequenciamento de genoma completo. Isto indica que a resistência a esses antimicrobianos está sendo mediada por outros mecanismos, como, por exemplo, barreiras de permeabilidade, bombas de efluxo ou mutações nas enzimas-alvo (FÀBREGA et al., 2009; HUOVINEN, 2001; MUNITA; ARIAS, 2016; RUIZ, 2003). Em contrapartida, nos isolados de *K. pneumoniae*, *E. asburiae* e *E. kobei*, que foram sensíveis a fosfomicina, foi identificado o gene *fosA*, que confere resistência a esse antimicrobiano. Assim, presume-se que este gene está sendo expresso em níveis muito baixos ou, de fato, não está sendo expresso (ENNE et al., 2006; ENNE; BENNETT, 2010; FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001).

É interessante notar que isolados pertencendo ao mesmo ST apresentaram genes de resistência diferentes, como no caso dos isolados do ST38 de *E. coli* e os isolados do ST198 de *K. pneumoniae*. Adicionalmente, os isolados de *K. pneumoniae* compartilharam os mesmos plasmídeos, os quais apresentaram a mesma fórmula de ST

plasmidial. Isso demonstra que isolados clonais, mesmo carregando o mesmo plasmídeo, não necessariamente apresentam um perfil idêntico de resistência a antimicrobianos. O mesmo princípio se aplica aos genes de virulência, os quais também variaram dentro de um mesmo ST.

Os resultados referentes aos plasmídeos mostraram uma diversidade de grupos de incompatibilidade plasmidial, incluindo grupos não identificados previamente pela técnica de PBRT. Todavia, as técnicas utilizadas no estudo não foram suficientes para determinar quais genes (de resistência ou virulência) estão presentes em cada plasmídeo. Entre os plasmídeos do grupo IncF foi possível observar uma diversidade de replicons, inclusive prováveis novos replicons, corroborando dados da literatura que têm descrito o IncF como um grupo não homogêneo (COQUE et al., 2008; OSBORN et al., 2000; SHIN; CHOI; KO, 2012; VILLA et al., 2010; YANG et al., 2015).

Entre os replicons de IncF encontrados neste trabalho, F31:A4:B10 e F1:A6:B20, carregando o gene *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, foram os únicos que não foram classificados como possíveis novos replicons. O replicon F31:A4:B10 foi descrito uma única vez em um isolado multi-resistente de *E. coli* carregando o gene *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, na Inglaterra (HOPKINS et al., 2006). Já o replicon F1:A6:B20 foi previamente descrito em isolados de *E. coli* na Suécia, associado ao grupo *bla*$_{\text{CTX-M-9}}$ (BROLUND et al., 2013); no Japão, associado ao gene *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$ (MATSUMURA et al., 2013); e na França, associado ao gene *bla*$_{\text{CTX-M-27}}$ (BLANC et al., 2014). Por outro lado, assim como observado neste estudo, o IncI1/ST80 parece, de fato, estar associado à disseminação do gene *bla*$_{\text{CTX-M-14}}$, tendo sido encontrado em *E. coli* isoladas de vitelo, na Holanda (HORDIJK et al., 2013); em *Salmonella* sorotipo Heidelberg isolada de carne de frango, proveniente de local não especificado (LIAKOPOULOS et al., 2016a); e em *E. coli* isoladas de gaivotas selvagens, em Ushuaia, na Argentina (LIAKOPOULOS et al., 2016b). Em relação a este último estudo, é interessante salientar que uma dessas cepas pertencia ao ST10 de *E. coli* (LIAKOPOULOS et al., 2016b), o mesmo ST identificado em uma das cepas portadoras do plasmídeo IncI1/ST80, neste estudo. Este fato permite levantar uma hipótese sobre o papel de aves selvagens como agentes de disseminação de bactérias multi-resistentes em regiões remotas da América Latina. Já o IncI1/ST131 foi reportado uma única vez, também associado ao gene *bla*$_{\text{CTX-M-8}}$, em isolados de *E. coli* provenientes de frangos, no estado de São Paulo, Brasil (FERREIRA et al., 2016).

Nenhum dos sorotipos identificados neste trabalho, tanto de *E. coli* quanto de *K. pneumoniae*, está associado a linhagens pandêmicas (HEINZ et al., 2016; MANGES et

al., 2008; RILEY, 2014). Entretanto, cepas de *E. coli* ST38, sorotipo O86:H18, foram descritas como o grupo clonal mais comum em surtos de infecção hospitalar causadas por *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) produtora de ESBL, no Japão, entre 2002 e 2003 (SUZUKI et al., 2009). Duas das cepas reportadas neste trabalho, uma de origem humana e outra de origem animal, pertencem a este mesmo sorotipo e a este mesmo ST. Além disso, ambas as cepas apresentaram o gene *nfaE*, que é um dos marcadores de virulência de ExPEC (CHAPMAN et al., 2006). Adicionalmente, a maioria das cepas de *E. coli* apresentaram os genes *air*, *astA* e *eilA*, que são genes de virulência de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (HARRINGTON et al., 2009; KONNO; YATSUYANAGI; SAITO, 2012; SHEIKH et al., 2006), e o gene *lpfa*, que é um gene de virulência encontrado em *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (AFSET et al., 2006). Contudo, a presença desses genes não é suficiente para classificar esses isolados nesses patotipos, visto que para isso são necessários ensaios de interação celular, que são os testes padrão-ouro para diagnóstico e diferenciação de patotipos de *E. coli* (ARENAS-HERNÁNDEZ; MARTÍNEZ-LAGUNA; TORRES, 2012; NANDANWAR et al., 2014).

Embora cepas com tais marcadores de virulência possam estar presentes na microbiota comensal sem causar infecção (CABAL et al., 2016; WANG; WU; CAO, 2015), como reportado neste trabalho, isto representa um potencial risco à saúde dos indivíduos ou animais portadores. Ademais, a associação de genes de virulência com genes de resistência a múltiplos antimicrobianos torna a situação ainda mais preocupante. Por um lado, o uso de antimicrobianos pode promover a seleção de bactérias portadoras de genes de virulência, contribuindo para uma rápida disseminação desses genes na população bacteriana. Por outro lado, genes de virulência podem facilitar a estabilização de genes de resistência em bactérias patogênicas (BOERLIN et al., 2005).

De modo geral, sabendo que a população deste estudo está localizada em uma área remota e que tem baixa exposição a antimicrobianos, a prevalência de isolados resistentes encontrada é preocupante, especialmente quando comparada à prevalência encontrada em ambientes com altas taxas de uso de antimicrobianos (CASSETTARI et al., 2009; GARRIDO et al., 2013; PASRICHA et al., 2013). Infelizmente, não foi possível obter dados referentes à última vez que esses indivíduos fizeram uso de antimicrobianos ou se foram previamente hospitalizados, o que representa uma limitação do trabalho.

Considerando as características sócio-demográficas da população e as características geográficas da região do estudo, a detecção de bactérias multi-resistentes com perfis genotípicos altamente similares aos descritos em outras regiões reforça a hipótese de que a resistência adquirida aos β-lactâmicos de amplo espectro pode ser mediada pela disseminação de bactérias e/ou seus determinantes de resistência a partir de áreas urbanizadas com alta exposição a antimicrobianos. Neste contexto, podem ser discutidos possíveis fatores contribuintes para a introdução dessas bactérias nessa população, como o contato com pessoas de áreas altamente expostas a antimicrobianos, a ingestão de alimentos importados e o contato com animais e/ou aves contaminados.

O fluxo migratório de militares vindos de outras regiões do país, principalmente os que trabalham no setor da saúde, é uma das principais hipóteses para o surgimento de bactérias multi-resistentes nesta população. Esses indivíduos podem ter sido colonizados durante sua atuação profissional em ambientes hospitalares de outras cidades ou estados e, então, transmitido essas bactérias para pacientes hospitalizados no HGuSGC. Todavia, a aquisição dessas bactérias pode ter ocorrido não apenas em ambientes hospitalares, mas também no próprio ambiente comunitário, através do contato com indivíduos colonizados, oriundos de outras cidades.

Visto que a produção agrícola local não é suficiente para suprir as necessidades de consumo da população, o consumo de alimentos importados de outras cidades ou estados é também uma hipótese a ser considerada, uma vez que bactérias resistentes a antimicrobianos são frequentemente descritas em alimentos (BOTELHO et al., 2015; CORMIER et al., 2016; MONTE et al., 2017; MOURA et al., 2017; RANDALL et al., 2017).

Outra hipótese a ser considerada é a contaminação por contato com animais e/ou aves selvagens. Sabe-se que as enterobactérias têm capacidade de adaptação a diferentes hospedeiros, e tanto animais como aves podem adquiri-las, através de contaminação ambiental, e atuar como reservatórios e veículos de transmissão das mesmas. Neste âmbito, diversos estudos já descreveram a presença de bactérias produtoras de ESBL nesses hospedeiros (BACHIRI et al., 2017; BAEZ et al., 2015; BONNEDAHL et al., 2015; BONNEDAHL; JÄRHULT, 2014; CRISTOVÃO et al., 2017; LIAKOPOULOS et al., 2016b; LONCARIC et al., 2016; RAZA et al., 2017). Ademais, as aves podem promover a disseminação de bactérias multi-resistentes a longas distâncias, devido às suas longas rotas de migração (INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2016).

Atualmente são conhecidas as principais rotas de migração de aves neárticas (provenientes do hemisfério norte) nas Américas (Figura 7) e sabe-se que aves que saem do interior do Canadá e dos Estados Unidos migram pelas áreas de baixa elevação do leste americano, passando pelo Golfo do México e Ilhas do Mar das Antilhas, chegando à América do Sul pela costa da Colômbia, Venezuela e Guianas e, a partir de então, utilizam as diversas rotas no interior do país (ICMBIO, 2016).

Figura 7 - Mapa das principais rotas de migração de aves nas Américas

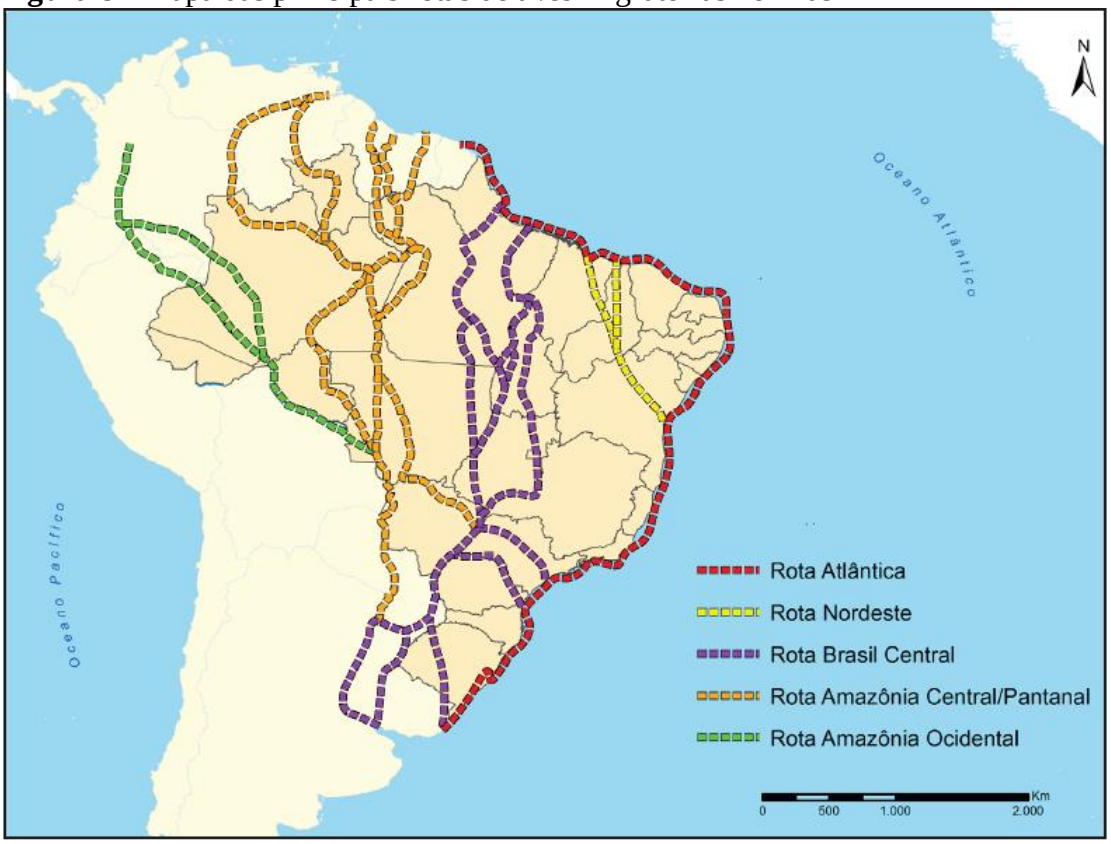
Fonte: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade; 2016.

No Brasil, há cinco rotas migratórias principais, sendo que uma delas é a rota Amazônia Central/Pantanal (Figura 8). Nesta rota, uma das principais chegadas é pelo Rio Negro (ICMBIO, 2016). Neste ponto vale lembrar que estudos previamente realizados na Guiana Francesa, em 2006 e 2010, detectaram a presença de enterobactérias produtoras de ESBL do tipo CTX-M em uma comunidade remota de índios Wayampis (WOERTHER et al., 2010, 2013b). Portanto, ao se fazer uma análise sobre a detecção de ESBLs nesses estudos e neste presente estudo, bem como as rotas

de migração dessas aves, reforça-se a hipótese de uma possível atuação das aves migratórias na introdução de bactérias multi-resistentes no município de São Gabriel da Cachoeira.

Adicionalmente, há as aves limícolas, que migram do ártico para a América do Sul e entram na Amazônia brasileira pelo caminho dos grandes rios, seguindo até o sul do Brasil ou até a Terra do Fogo, no extremo sul do continente (ICMBIO, 2016). Aqui vale lembrar o trabalho realizado por Liakopoulos et al. (2016b) – previamente citado nesta discussão – em que cepas de *E. coli* isoladas de gaivotas selvagens, em Ushuaia, capital da província da Terra do Fogo, em 2012, apresentaram o mesmo gene de resistência, o mesmo ST da cepa, o mesmo Inc e o mesmo ST plasmidial de uma cepa identificada no presente estudo. Considerando que as cepas deste estudo foram coletadas no ano de 2013, pode-se levantar a hipótese de que esta cepa já circulava na região de São Gabriel da Cachoeira nos anos anteriores e foi disseminada até Ushuaia por aves migratórias, ou que foi levada de Ushuaia para São Gabriel da Cachoeira durante a migração de volta. Por outro lado, pouco se sabe sobre as rotas de migração da Antártica e do extremo sul da América do Sul para o Brasil (ICMBIO, 2016).

Figura 8 - Mapa das principais rotas de aves migratórias no Brasil



Fonte: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade; 2016.

Uma vez inseridas na comunidade, as bactérias multi-resistentes podem ter se disseminado de diversas formas. Indivíduos que tenham sido hospitalizados e adquirido essas bactérias podem ser importantes veículos de disseminação na sede do município e nas aldeias, como já mostrado por outros estudos (RODRÍGUEZ-BAÑO et al., 2008; LO et al., 2010; KOJIMA et al., 2014).

A detecção de bactérias de um mesmo ST em indivíduos de etnias diferentes evidencia a dispersão dessas bactérias em diferentes aldeias. O ST38 foi detectado em isolados de indivíduos das etnias Hupda, Piratapuya e Tukano; o novo ST (ST6993) foi detectado em isolados de indivíduos das etnias Baniwa e Hupda; e cada um dos isolados de *K. pneumoniae* – pertencentes ao mesmo ST (ST198) – foi proveniente de indivíduos de diferentes etnias (Baniwa, Hupda, Tariano, Tukano e Werequino). Embora as aldeias dessas etnias estejam localizadas em diferentes pontos do município, ao longo dos rios ou floresta adentro, sabe-se que há uma dinâmica populacional, com constante movimentação de indivíduos entre as aldeias, no interior, e a sede do município, onde não há segregação étnica. Dessa forma, o contato, mesmo que mínimo, entre indivíduos de diferentes etnias, na sede do município, pode ter contribuído para a dispersão dessas bactérias nesses diferentes grupos. Por outro lado, a relação clonal entre cepas de origem humana e de cães evidencia o importante papel dos animais de estimação na disseminação, uma vez que estes trafegam livremente por toda a área da cidade.

O sistema precário de abastecimento de água e a falta de sistemas de coleta e tratamento de esgotos na cidade são, também, importantes fatores contribuintes para a dispersão de bactérias multi-resistentes. Resíduos sólidos e efluentes do único ponto de captação de esgoto existente são lançados em igarapés que deságuam no rio Negro, à montante de um ponto de captação de água para abastecimento da cidade. Ainda mais alarmante é o fato de que essa água é distribuída diretamente para a população sem passar por nenhum tipo de tratamento (GIATTI, 2007). Essa situação facilita a dispersão das bactérias multi-resistentes não apenas na população da cidade de São Gabriel da Cachoeira, mas em todas as comunidades situadas às margens do rio Negro à jusante desse ponto.

Embora, na maioria das vezes, a ocorrência de bactérias multi-resistentes produtoras de ESBL esteja associada a regiões totalmente urbanizadas e com alta exposição a antimicrobianos, os resultados deste trabalho demonstram a capacidade dessas bactérias serem introduzidas e se dispersarem em regiões remotas com baixa

exposição a antimicrobianos. Nesse âmbito, interações inter-pessoais e com o ambiente parecem ser importantes fatores de risco no processo de dispersão. A presença de genes codificadores de ESBL e carbapenemase na microbiota comensal de indivíduos de uma comunidade remota no Brasil é um resultado inédito que demonstra que a disseminação de um problema endêmico em áreas urbanas para uma comunidade, em teoria, com baixa exposição a antibacterianos está acontecendo, sendo que as fontes e/ou veículos de aquisição são dignas de investigação, para um controle epidemiológico.

6 CONCLUSÕES

- Foi detectada a presença de enterobactérias produtoras de β-lactamases na microbiota comensal de humanos e animais domésticos de uma comunidade remota no interior do estado do Amazonas;
- A espécie bacteriana prevalente entre os isolados foi *E. coli*, seguida por *K. pneumoniae*;
- Quatorze isolados de origem humana e cinco isolados de origem animal apresentaram perfil fenotípico para produção de ESBL e resistência a múltiplas classes de antimicrobianos;
- Os genes codificadores de ESBL mais encontrados foram $bla_{\text{CTX-M-15}}$ e $bla_{\text{CTX-M-14}}$;
- Um isolado de origem humana apresentou resistência a cefalosporinas e imipenem e foi detectada, pela primeira vez no mundo, a presença do gene $bla_{\text{GES-5}}$ em *M. morganii*;
- Foi observada uma diversidade clonal entre os isolados de *E. coli*, com detecção de STs mundialmente disseminados e também de um novo ST de *E. coli* (ST6993);
- Os isolados de *K. pneumoniae* foram representados por um único clone (ST198);
- Alguns isolados de *E. coli* de humanos e animais foram clonalmente relacionados, sugerindo a disseminação dessas bactérias entre esses hospedeiros;
- Apenas nove plasmídeos carregando os genes $bla_{\text{CTX-M-14}}$ (n = 4), $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (n = 3) e $bla_{\text{CTX-M-8}}$ (n = 2) foram mobilizados, pela técnica de conjugação;
- O gene $bla_{\text{GES-5}}$ e dois genes $bla_{\text{CTX-M-14}}$ foram encontrados no cromossomo;
- Os grupos de incompatibilidade plasmidial encontrados (IncF, IncI1 e IncL/M) estão entre os mais disseminados no mundo;
- IncF e IncI1 foram associados aos genes $bla_{\text{CTX-M-15}}$ e $bla_{\text{CTX-M-14}}$, respectivamente;
- Os plasmídeos da família IncF foram caracterizados por diferentes replicons, enquanto todos os plasmídeos do IncI1 foram pertencentes ao ST80;
- Os resultados deste trabalho demonstram a disseminação de um problema endêmico de áreas urbanas para uma comunidade remota, em teoria, com baixa exposição a antibióticos.

REFERÊNCIAS*

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 677-678, 1988.

AFSET, J. E. et al. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3703-3711, 2006.

ALCALA, L. et al. Wild birds, frequent carriers of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 types. **Microbial Ecology**, v. 72, n. 4, p. 861-869, 2016.

ALGHORIBI, M. F. et al. Antibiotic-resistant ST38, ST131 and ST405 strains are the leading uropathogenic *Escherichia coli* clones in Riyadh, Saudi Arabia. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 10, p. 2757-2762, 2015.

AMBLER, R. P. et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochemical Journal**, v. 276, n. Pt 1, p. 269-270, 1991.

ANSSOUR, L. et al. ESBL, plasmidic AmpC, and associated quinolone resistance determinants in coliforms isolated from hospital effluent: first report of *qnrB2*, *qnrB9*, *qnrB19*, and $bla_{\text{CMY-4}}$ in Algeria. **Journal of Chemotherapy**, v. 26, n. 2, p. 74-79, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Antimicrobianos - bases teóricas e uso clínico. 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm. Acesso em: 27 mar. 2017.

AMAZONENSE, T. A. **Territorialização do patrimônio no alto rio Negro: da geografia mítica a geografia indígena.** 2013. 144 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Instituto de Ciências Humanas e Letras, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

ARENAS-HERNÁNDEZ, M. M. P.; MARTÍNEZ-LAGUNA, Y.; TORRES, A. G. Clinical implications of enteroadherent *Escherichia coli*. **Current Gastroenterology Reports**, v. 14, n. 5, p. 386-394, 2012.

ARYA, S. C.; AGARWAL, N. International travel with acquisition of multi-drug resistant Gram negative bacteria containing the New Delhi metallo-beta-lactamase gene, $bla_{\text{NDM-1}}$. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 9, n. 1, p. 47-48, 2011.

AUBERT, D. et al. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 1615-1620, 2001.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AYDIN, F. et al. Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 1, p. 27-35, 2007.

BABINI, G. S.; LIVERMORE, D. M. Are SHV beta-lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 8, p. 2230, 2000.

BACHIRI, T. et al. High rates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in wild boars and Barbary macaques in Algeria. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 8, p. 35-40, 2017.

BAEZ, J. et al. Molecular characterization and genetic diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* colonizing the migratory Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) in Antofagasta, North of Chile. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 1, p. 111-116, 2015.

BARTHELEMY, M.; PEDUZZI, J.; LABIA, R. Complete amino acid sequence of p453-plasmid-mediated PIT-2 beta-lactamase (SHV-1). **The Biochemical Journal**, v. 251, n. 1, p. 73-79, 1988.

BARTOLONI, A. et al. High prevalence of acquired antimicrobial resistance unrelated to heavy antimicrobial consumption. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 7, p. 1291-1294, 2004.

BARTOLONI, A. et al. Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 2, p. 125-129, 2009.

BARTOLONI, A. et al. Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli*: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 4, p. 356-361, 2013.

BARTON, B. M.; HARDING, G. P.; ZUCCARELLI, A. J. A general method for detecting and sizing large plasmids. **Analytical biochemistry**, v. 226, n. 2, p. 235-240, 1995.

BASSETTI, M. et al. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, p. 1, 2013.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BAUERNFEIND, A. et al. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. **Infection**, v. 20, n. 3, p. 158-163, 1992.

BAUERNFEIND, A.; SCHWEIGHART, S.; GRIMM, H. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, v. 18, n. 5, p. 294-298, 1990.

BIMBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

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

BOERLIN, P. et al. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6753-6761, 2005.

BONNEDAHL, J. et al. Comparison of Extended-Spectrum β-Lactamase (ESBL) CTX-M Genotypes in Franklin Gulls from Canada and Chile. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, 2015.

BONNEDAHL, J.; JÄRHULT, J. D. Antibiotic resistance in wild birds. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 119, n. 2, p. 113-116, 2014.

BONNET, R. et al. A novel CTX-M β-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1936-1942, 2000.

BONNET, R. et al. 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.

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.

BONNIN, R. A. et al. Detection of GES-5 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*, a newcomer in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 3, 2017.

BONOMO, R. A. β-Lactamases: a focus on current challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 1, 2017.

BÖRJESSON, S. et al. Limited dissemination of extended-spectrum β-lactamase and plasmid-encoded AmpC-producing *Escherichia coli* from food and farm animals, sweden. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 634-640, 2016.

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

BOYLE, F. et al. Characterization of a novel extended-spectrum β-lactamase phenotype from OXA-1 expression in *Salmonella* Typhimurium strains from Africa and Ireland. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, n. 4, p. 549-553, 2011.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta-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.

BREILH, D. et al. Carbapenems. **Journal of Chemotherapy**, v. 25, n. 1, p. 1-17, 2013.

BROLUND, A. et al. Plasmidome-analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* using conventional typing and high-throughput sequencing. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β-lactams and β-lactamase inhibitors: an overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 8, 2016.

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

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, n. 6, p. 1211-1233, 1995.

CABAL, A. et al. Prevalence of *Escherichia coli* virulence genes in patients with diarrhea and a subpopulation of healthy volunteers in Madrid, Spain. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 641, 2016.

CAN, F. et al. Emerging *Escherichia coli* O25b/ST131 clone predicts treatment failure in urinary tract infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 4, p. 523-527, 2015.

CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M enzymes: origin and diffusion. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 110, 2012.

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

CARATTOLI, A. et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β-lactamases isolated in Rome, Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 103-108, 2008.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227-2238, 2009.

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

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 298-304, 2013.

CARATTOLI, A. et al. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3895-3903, 2014.

CARLET, J. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 1, n. 1, p. 39, 2012.

CHAPMAN, P. A. et al. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 1-2, p. 11-20, 2001.

CHAPMAN, T. A. et al. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4782-4795, 2006.

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Quality Manual; Third Edition. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2013.

CONTE, D. et al. Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 62-69, 2017.

COQUE, T. M. et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β-lactamase CTX-M-15. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 195-200, 2008.

CORMIER, A. C. et al. Extended-spectrum-cephalosporin resistance genes in *Escherichia coli* from beef cattle. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 1162-1163, 2016.

CRISTOVÃO, F. et al. Clonal diversity of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates in fecal samples of wild animals. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 5, 2017.

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

CURIAO, T. et al. Association of composite IS26-sul3 elements with highly transmissible IncI1 plasmids in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* clones from humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 2451-2457, 2011.

D'ANDREA, M. M. et al. CTX-M-type β-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 305-317, 2013.

DA FONSECA, E. L. et al. Emergence of bla_{GES-5} in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 576-577, 2007.

DAMJANOVA, I. et al. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005-the new "MRSAs"? **The Journal of**

Antimicrobial Chemotherapy, v. 62, n. 5, p. 978-985, 2008.

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. **Nature**, v. 208, n. 5007, p. 239-241, 1965.

DIANCOURT, L. et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4178-4182, 2005.

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

DORTET, L. et al. NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Sultanate of Oman. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 5, 2012.

DROPA, M. **Caracterização genotípica de cepas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de β-lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo.** 2006. 116 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DROPA, M. **Disseminação da resistência a antimicrobianos em cepas clínicas e ambientais de *Enterobacteriaceae*: identificação e mapeamento do ambiente genético de genes codificadores de ESBL.** 2012. 121 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

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

DROPA, M. et al. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 4953-4958, 2016.

EL SALABI, A.; WALSH, T. R.; CHOUCHANI, C. Extended spectrum beta-lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 113-122, 2013.

ELLER, C. et al. Emergence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) CTX-M-8 in Germany. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 2, p. 562-564, 2014.

ELOY, L.; LASMAR, C. Urbanização e transformação dos sistemas indígenas de manejo de recursos naturais : o caso do alto rio Negro (Brasil). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 1, p. 91-102, 2011.

ENNE, V. I. et al. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 3003-3010, 2006.

ENNE, V. I.; BENNETT, P. M. Methods to determine antibiotic resistance gene silencing. **Methods in Molecular Biology**, v. 642, p. 29-44, 2010.

EUROPEAN COMMITEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014.

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. OXA β-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 241-263, 2014.

EWERS, C. et al. Extended-spectrum β-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 646-655, 2012.

EWERS, C. et al. Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2676-2680, 2014.

FÀBREGA, A. et al. Mechanism of action of and resistance to quinolones. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n.1, p. 40-61, 2009.

FEDERAÇÃO DAS ORGANIZAÇÕES INDÍGENAS DO RIO NEGRO. Área de abrangência da Foirn. Disponível em: http://www.foirn.org.br/sobre-foirn/mapa-da-abrangencia/post-5/. Acesso em: 4 abr. 2017.

FEHLBERG, L. C. C. et al. Beta-lactam resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing bloodstream infections: comparative results between Brazilian and American isolates. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 4, p. 402-407, 2012.

FERNANDES, R.; AMADOR, P.; PRUDÊNCIO, C. β-Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 24, n. 1, 2013.

FERNANDEZ-CANIGIA, L.; DOWZICKY, M. J. Susceptibility of important Gram-negative pathogens to tigecycline and other antibiotics in Latin America between 2004 and 2010. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 11, p. 29, 2012.

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

FLUIT, A. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. J. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 836-871, 2001.

FRANCIA, M. V. et al. A classification scheme for mobilization regions of bacterial

plasmids. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 79-100, 2004.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) isolated in hospitals in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 1, n. 4, p. 196-203, 1997.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY antimicrobial surveillance program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 354-360, 2012.

GARCIA-FERNANDEZ, A. et al. Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1229-1233, 2008.

GARREC, H. et al. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum β-lactamase production by *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 1048-1057, 2011.

GIATTI, L. L. Reflexões sobre água de abastecimento e saúde pública: um estudo de caso na Amazônia brasileira**. Saúde e Sociedade**, v. 16, n. 1, p. 134-144, 2007.

GOOGLE MAPS. São Gabriel da Cachoeira. 2017. Disponível em: https://www.google.com.br/maps/place/S%C3%A3o+Gabriel+da+Cachoeira+-+AM/@-0.9152746,-67.971549,5z/data=!4m5!3m4!1s0x8dfff222fbed4731:0x866b351c927739f8!8m2!3d0.5582388!4d-68.1431414. Acesso em: 4 abr. 2017.

GRENET, K. et al. Antibacterial resistance, Wayampis Amerindians, French Guyana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 1150-1153, 2004.

GUENTHER, S. et al. Chromosomally encoded ESBL genes in *Escherichia coli* of ST38 from Mongolian wild birds. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, p. 1310-1313, 2017

GUENTHER, S.; EWERS, C.; WIELER, L. H. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 246, 2011.

GUIRAL, E. et al. CTX-M-15-producing enteroaggregative *Escherichia coli* as cause of travelers' diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1950-1953, 2011.

GUTKIND, G. O. et al. beta-lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 2, p. 164-208, 2013.

GUZMÁN-BLANCO, M. et al. Extended spectrum β-lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 421-433, 2014.

HAMAMOTO, K. et al. High prevalence of chromosomal *bla*(CTX-M-14) in *Escherichia coli* isolates possessing *bla*(CTX-M-14). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2582-2584, 2016.

HANSEN, K. H. et al. Host-specific patterns of genetic diversity among IncI1-Iϒ and IncK plasmids encoding CMY-2 beta-lactamase in *Escherichia coli* isolates from humans, poultry meat, poultry, and dogs in Denmark. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 15, p. 4705-4714, 2016.

HARRINGTON, S. M. et al. The pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin . **Infection and Immunity**, v. 77, n. 6, p. 2465-2473, 2009.

HARRIS, P. N. A.; FERGUSON, J. K. Antibiotic therapy for inducible AmpC beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli: what are the alternatives to carbapenems, quinolones and aminoglycosides? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 4, p. 297-305, 2012.

HAWSER, S. P. et al. Low frequency of ertapenem-resistant intra-abdominal isolates of *Escherichia coli* from Latin America: susceptibility, ESBL-occurrence, and molecular characterisation (SMART 2008-2009). **Journal of Chemotherapy**, v. 24, n. 1, p. 6-11, 2012.

HEINZ, E. et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. **Microbial Genomics**, v. 2, n. 8, 2016.

HOLMES, R. K.; JOBLING, M. G. Genetics. In: BARON, S. **Medical Microbiology.** 4th ed. Galveston, 1996. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7908/. Acesso em: 13 abr. 2017.

HOPKINS, K. L. et al. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY β-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 3203-3206, 2006.

HORDIJK, J. et al. Cross-sectional study on prevalence and molecular characteristics of plasmid mediated ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* isolated from veal calves at slaughter. **PloS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

HUBSCHWERLEN, C. β-Lactam Antibiotics. In: **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. 2007. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B008045044X002182. Acesso em: 02 abr. 2017.

HUOVINEN, P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 11, p. 1608-1614, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. São Gabriel da Cachoeira. 2010. Disponível em: http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=130380. Acesso em: 4 abr. 2017.

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

JARLIER, V. et al. Extended broad-spectrum β-lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Clinical Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 867-878, 1988.

KARANIKA, S. et al. Fecal colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and risk factors among healthy individuals: a systematic review and metaanalysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 3, p. 310-318, 2016.

KAZMIERCZAK, K. M. et al. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* in intra-abdominal infection isolates in Latin America, 2008-2012. Results of the study for monitoring antimicrobial resistance trends. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 3, p. 209-214, 2015.

KIIRU, J. et al. Analysis of beta-lactamase phenotypes and carriage of selected beta-lactamase genes among *Escherichia coli* strains obtained from Kenyan patients during an 18-year period. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 155, 2012.

KIM, J. et al. Emergence of *Escherichia coli* sequence type ST131 carrying both the $bla_{\text{GES-5}}$ and $bla_{\text{CTX-M-15}}$ genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 2974-5, 2011a.

KIM, J. et al. Characterization of IncF plasmids carrying the $bla_{\text{CTX-M-14}}$ gene in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 6, p. 1263-1268, 2011b.

KIM, S. et al. Characteristics of the molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolated from a tertiary hospital in Daejeon, Korea. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 9, p. 1643-1649, 2016.

KNOTHE, H. et al. 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, Y. et al. Spread of CTX-M-15 extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates through household contact and plasmid transfer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1783-1785, 2014.

KONG, K. F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 118, n. 1, p. 1-36, 2010.

KONNO, T.; YATSUYANAGI, J.; SAITO, S. Virulence gene profiling of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1-harboring *E. coli* (EAST1EC) derived from sporadic diarrheal patients. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 314-320, 2012.

KOTRA, L. P.; MOBASHERY, S. Mechanistic and clinical aspects of beta-lactam antibiotics and beta-lactamases. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 47, n. 4, p. 211-216, 1999.

KOTTARA, A. et al. Multi-host environments select for host-generalist conjugative plasmids. **BMC Evolutionary Biology**, v. 16, n. 1, p. 70, 2016.

LAHEY. CTX-M-type β-Lactamases. 2016. Disponível em: http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1. Acesso em: 30 mar. 2017.

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

LAWLEY, T.; FROST, L. S.; WILKINS, B. M. Bacterial conjugation in Gram-negative bacteria. In: **Plasmid Biology**. Washington: ASM Press, 2004. p. 203-226.

LEINER, P. Uma "volta rápida" em São Gabriel da Cachoeira: experimento sobre navegação social. **Ponto Urbe**. 2014. Disponível em: https://pontourbe.revues.org/1370#quotation. Acesso em: 4 abr. 2017.

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

LEPLAE, R. et al. ACLAME: a CLAssification of Mobile genetic Elements. **Nucleic Acids Research**, v. 32, 2004.

LI, B. et al. High prevalence of CTX-M β-lactamases in faecal *Escherichia coli* strains from healthy humans in Fuzhou, China. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 43, n. 3, p. 170-174, 2011.

LIAKOPOULOS, A. et al. Extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg strains, the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1257-1261, 2016a.

LIAKOPOULOS, A. et al. Molecular characterization of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* from wild Kelp Gulls in South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6924-6927, 2016b.

LIAO, X.-P. et al. Characterization of CTX-M-14-producing *Escherichia coli* from food-producing animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1136, 2015.

LIU, B.-T. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qepA1* and extended-spectrum β-lactamase gene $bla_{\text{CTX-M-14}}$ co-located on the same plasmid in two *Escherichia coli* strains from China. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 603-605, 2012.

LIU, B.-T. et al. Dissemination and characterization of plasmids carrying *oqxAB-bla*$_{(\text{CTX-M})}$ genes in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. **PLoS ONE**,

v. 8, n. 9, 2013.

LIVERMORE, D. M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.

LO, W. U. et al. Fecal carriage of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms by children and their household contacts. **Journal of Infection**, v. 60, n. 4, p. 919-924, 2014.

LONCARIC, I. et al. Characterization of ESBL- and AmpC-Producing and Fluoroquinolone-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated from Mouflons (*Ovis orientalis musimon*) in Austria and Germany. **PloS ONE**, v. 11, n. 5, 2016.

LYE, D. C. et al. The impact of multidrug resistance in healthcare-associated and nosocomial Gram-negative bacteraemia on mortality and length of stay: cohort study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 5, p. 502-508, 2012.

MÜLLER, A.; STEPHAN, R.; NÜESCH-INDERBINEN, M. Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. **Science of the Total Environment**, v. 541, p. 667-672, 2016.

MAC AOGAIN, M.; ROGERS, T. R.; CROWLEY, B. Identification of emergent bla_{CMY-2}-carrying *Proteus mirabilis* lineages by whole-genome sequencing. **New Microbes and New Infections**, v. 9, p. 58-62, 2016.

MACFARLANE, S. Antibiotic treatments and microbes in the gut. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 919-924, 2014.

MACHADO, E. et al. Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 3220-3221, 2006.

MACHADO, E. et al. Commensal *Enterobacteriaceae* as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and *sul* genes in Portugal. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 80, 2013.

MADEC, J.-Y. et al. Extended-spectrum beta-lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals: a threat for humans? **Clinical Microbiology and Infection**, [Epub ahead of print] 2017.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MALKOCOGLU, G. et al. VIM-1, VIM-2, and GES-5 carbapenemases among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates at a tertiary hospital in Istanbul, Turkey. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 3, p. 328-334, 2017.

MANAGEIRO, V. et al. GES-5 among the β-lactamases detected in ubiquitous bacteria isolated from aquatic environment samples. **FEMS Microbiology Letters**, v. 351, n. 1, p. 64-69, 2014.

MANGES, A. R. et al. Endemic and epidemic lineages of *Escherichia coli* that cause urinary tract infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 10, p. 1575-1583, 2008.

MARTIN, S. I.; KAYE, K. M. Beta-lactam antibiotics: newer formulations and newer agents. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 18, n. 3, p. 603-619, 2004.

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 565-591, 2015.

MATSUMURA, Y. et al. Association of fluoroquinolone resistance, virulence genes, and IncF plasmids with extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) and ST405 clonal groups. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4736-4742, 2013.

MATTHEW, M.; HEDGES, R. W.; SMITH, J. T. Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 657-662, 1979.

MINARINI, L. A. R. et al. Prevalence of community-occurring extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Current Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 335-341, 2007.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO. Plano de etnodesenvolvimento do terrirório Rio Negro da cidadania indígena. 2009. Disponível em: http://sit.mda.gov.br/download/ptdrs/ptdrs_qua_territorio136.pdf. Acesso em: 4 abr. 2017.

MIRÓ, E. et al. Emergence of clinical *Escherichia coli* isolates with decreased susceptibility to ceftazidime and synergic effect with co-amoxiclav due to SHV-1 hyperproduction. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 4, p. 535-538, 1998.

MIYOSHI-AKIYAMA, T. et al. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

MONTE, D. F. et al. Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying *mcr-1* genes in South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, 2017.

MONTEIRO, J. et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 906-909, 2012.

MONTEZZI, L. F. et al. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 2, p. 174-177, 2015.

MOURA, Q. et al. Virulent nontyphoidal *Salmonella* producing CTX-M and CMY-2 beta-lactamases from livestock, food and human infection, Brazil. **Virulence**, [Epub ahead of print], 2017.

MSHANA, S. E. et al. Conjugative IncFI plasmids carrying CTX-M-15 among *Escherichia coli* ESBL producing isolates at a University hospital in Germany. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, n. 97, 2009.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.

MUZAHEED et al. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* among inpatients and outpatients with urinary tract infection in Southern India. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1393-1394, 2008.

NANDANWAR, N. et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) of human and avian origin belonging to sequence type complex 95 (STC95) portray indistinguishable virulence features. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 7, p. 835-842, 2014.

NICOLAS-CHANOINE, M. H. et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 273-281, 2008.

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

NORDSTROM, K. Plasmid R1 - Replication and its control. **Plasmid**, v. 55, n. 1, p. 1-26, 2006.

NOVICK, R. P. Plasmid incompatibility. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 4, p. 381-395, 1987.

NUGENT, M. E.; HEDGES, R. W. The nature of the genetic determinant for the SHV-1 beta-lactamase. **Molecular & General Genetics**, v. 175, n. 3, p. 239-243, 1979.

OSBORN, A. M. et al. Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. **Microbiology**, v. 146, p. 2267-2275, 2000.

ÖSTHOLM-BALKHED, Å. et al. Travel-associated faecal colonization with ESBL-producing *Enterobacteriaceae*: incidence and risk factors. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 9, p. 2144-2153, 2013.

OTEO, J. et al. CTX-M-15-producing urinary *Escherichia coli* O25b-ST131-phylogroup B2 has acquired resistance to fosfomycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 4, p. 712-717, 2009.

PALLECCHI, L. et al. Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1179-1184, 2007.

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4943-4960, 2011.
PATERSON, D.; BONOMO, R. Extended-spectrum β-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.

PENDERS, J. et al. The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 87, 2013.

PENG, C.; ZONG, Z. Sequence type 38 *Escherichia coli* carrying $bla_{\text{CTX-M-14}}$. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 694-695, 2011.

PEYMANI, A. et al. Emergence of CMY-2- and DHA-1-type AmpC beta-lactamases in *Enterobacter cloacae* isolated from several hospitals of Qazvin and Tehran, Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 168-174, 2016.

PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G. A. Plasmid-determined AmpC-type β-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 1-11, 2002.

PICÃO, R. C. et al. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 796-797, 2010.

PICÃO, R. C. et al. Diversity of β-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3908-3913, 2009.

POIREL, L. et al. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 934-936, 2011.

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

POLOTTO, M. et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring $bla_{\text{CTX-M-2}}$, $bla_{\text{GES-1}}$ and $bla_{\text{GES-5}}$, $bla_{\text{IMP-1}}$ and $bla_{\text{SPM-1}}$ causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, p. 1-8, 2012.

RAFAÏ, C. et al. Dissemination of IncF-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing *Enterobacteriaceae* isolates from surgical-site infections in Bangui, Central African Republic. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 15, 2015.

RAJAPANDIYAN, K. et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* among isolates from community-acquired infections and in silico structural modeling of an ESBL protein. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 2, p. 170-176, 2014.

RANDALL, L. P. et al. Evaluation of meat, fruit and vegetables from retail stores in five United Kingdom regions as sources of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 283-290, 2017.

RAZA, S. et al. First report of $bla_{\text{CTX-M-15-Type}}$ ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in wild migratory birds in Pakistan. **EcoHealth**, v. 14, n. 1, p. 182-186, 2017.

RIBEIRO, V. B. et al. Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 231-232, 2014a.

RIBEIRO, V. B. et al. Detection of $bla_{\text{GES-5}}$ in carbapenem-resistant *Kluyvera intermedia* isolates recovered from the hospital environment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 622-623, 2014b.

RICE, L. B. et al. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 beta-lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 362-367, 2000.

RILEY, L. W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 5, p. 380-390, 2014.

RIZEK, C. et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 43, 2014.

ROCA, I. et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New Microbes and New Infections**, v. 6, p. 22-29, 2015.

ROCHA, D. A. C. et al. Frequency of plasmid-mediated AmpC β-Lactamases in *Escherichia coli* isolates from urine samples in São Paulo, Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 321-327, 2015.

ROCHA, F. R.; PINTO, V. P. T.; BARBOSA, F. C. B. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: a systematic review. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 301–311, 2016.

RODRÍGUEZ, I. et al. Chromosomal location of $bla_{\text{CTX-M}}$ genes in clinical isolates of *Escherichia coli* from Germany, The Netherlands and the UK. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 6, p. 553-557.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J. et al. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. 1142-1149, 2008.

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

RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1109-1117, 2003.

RUPPÉ, E. et al. Carriage of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates among children living in a remote village in Senegal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 3135-3137, 2009.

SADER, H. S. et al. Evaluation of the in vitro activity of cefepime compared to other broad-spectrum cephalosporins against clinical isolates from eighteen Brazilian hospitals by using the etest. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 28, n. 2, p. 87-92, 1997.

SALLES, M. J. C. et al. Resistant gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 12, p. 2459-72, 2013.

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β-lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. Suppl 1, p. 31-37, 25 dez. 2016.

SCHWABER, M. J. et al. Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum-β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1257-1262, 2006.

SEIFFERT, S. N. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 3, p. 260-262, 2014.

SENNATI, S. et al. Changing epidemiology of extended-spectrum β-lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 6003-6005, 17 nov. 2012.

SHEIKH, J. et al. EilA, a HilA-like regulator in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 338-350, 2006.

SHIN, J.; CHOI, M.-J.; KO, K. S. Replicon sequence typing of IncF plasmids and the genetic environments of $bla_{\text{CTX-M-15}}$ indicate multiple acquisitions of $bla_{\text{CTX-M-15}}$ in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from South Korea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 8, p. 1853-1857, 2012.

SIROT, D. et al. 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, n. 3, p. 323-334, 1987.

SMILLIE, C. et al. Mobility of plasmids. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 434-452, 2010.

SOARES, R. M. **Das comunidades à federação: associações indígenas do Alto Rio Negro.** 2012. 160 f. Dissertação (Mestrado em Antropologia Social) - Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

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

SOUGAKOFF, W. et al. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in tem-type penicillinase genes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 879-884, 1988.

SPANU, T. et al. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: implications for resistance to beta-lactams and other antimicrobial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 196-202, 2002.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 2, p. 116-129, 2009.

SUCHER, A. J. et al. Ceftolozane/tazobactam: a new cephalosporin and β-lactamase inhibitor combination. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 49, n. 9, p. 1046-1056, 2015.

SUZUKI, S. et al. Change in the prevalence of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. 72-79, 2009.

TACAO, M.; CORREIA, A.; HENRIQUES, I. Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of bla_{CTX-M}-like genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4134-4140, 2012.

TANG, S. S.; APISARNTHANARAK, A.; HSU, L. Y. Mechanisms of beta-lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 78, p. 3-13, 2014.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1740-1534, p. 207-217, 2010.

TORRES, E. et al. Reduced susceptibility to cefepime in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing OXA-1 beta-lactamase. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 2, p. 141-146, 2016.

TROTT, D. β-lactam resistance in Gram-negative pathogens isolated from animals. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 2, p. 239-249, 2013.

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. J. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 479-487, 2003.

VIEDMA, E. et al. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 11, p. 4930-4933, 2009.

VILLA, L. et al. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. 2518-2529, 2010.

VILLEGAS, M. V. et al. Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase among Gram-negative bacilli in Latin America-2008: update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 34–39, 2011.

VON WINTERSDORFF, C. J. H. et al. High rates of antimicrobial drug resistance gene acquisition after international travel, The Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, p. 649-657, 2014.

VOURLI, S. et al. Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 234, n. 2, p. 209-213, 2004.

WANG, Y.; WU, J.; CAO, Y. The extended spectrum beta-lactamases (ESBL) and virulence genes of intestinal enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) in healthy elderly individuals. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 11, p. 20953-20958, 2015.

WHITE, L. et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in hospital wastewater: a reservoir that may be unrelated to clinical isolates. **The Journal of Hospital Infection**, v. 93, n. 2, p. 145-151, 2016.

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

WOERTHER, P.-L. et al. Emergence and dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the community: lessons from the study of a remote and controlled population. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 4, p. 515-523, 2010.

WOERTHER, P. L. et al. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 744-758, 2013a.

WOERTHER, P. L. et al. Characterization of fecal ESBL-producing *Escherichia coli* in a remote community during a long term period. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 5060-5066, 2013b.

WOLLHEIM, C. et al. Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum β-lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 138-143, 2011.

WOODFORD, N.; TURTON, J. F.; LIVERMORE, D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p. 736-755, 2011.

WOZNIAK, R. A. F.; WALDOR, M. K. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 552-63, 2010.

XAVIER, D. E. et al. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 217, 2010.

YANG, Q. E. et al. IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains from animals in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 964, 2015.

ZURFLUH, K. et al. Quinolone resistance mechanisms among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolated from rivers and lakes in Switzerland. **PloS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.