UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização fenotípica e molecular de enterobactérias
resistentes a antimicrobianos isoladas de aves comerciais de
granjas do interior do Estado de São Paulo**

Joseane Cristina Ferreira

**Ribeirão Preto
2018**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização fenotípica e molecular de enterobactérias
resistentes a antimicrobianos isoladas de aves comerciais de
granjas do interior do Estado de São Paulo**

**Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós –
Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em
Ciências**

**Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia**

Orientada: Joseane Cristina Ferreira

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ferreira, Joseane Cristina

Caracterização fenotípica e molecular de enterobactérias resistentes a antibióticos isoladas de aves comerciais de granjas do interior do estado de São Paulo. Ribeirão Preto, 2018.

79 p. : il. ; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas a Farmácia.

Orientador: **Darini, Ana Lúcia da Costa.**

1. Frangos. 2. β -lactamases. 3. Bactérias multirresistentes.

FOLHA DE APROVAÇÃO

FERREIRA, Joseane Cristina

Caracterização fenotípica e molecular de enterobactérias resistentes a antimicrobianos isoladas de aves comerciais de granjas do interior do Estado de São Paulo

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho

“À minha mãe, eterna guerreira ao meu lado; à minha filha Clara, meu mundo, minha alegria, minha vida; ao meu doce Dylan e ao meu esposo Rafael, o grande incentivador e companheiro nesta caminhada.”

Agradecimentos

À Profª Drª Ana Lúcia da Costa Darini, professora titular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP e coordenadora do Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular, pelas orientações durante toda a pós-graduação, e pela confiança em mim depositada. Agradeço o apoio, empenho, amizade e exemplo de profissionalismo durante esse período. Muito obrigada por tudo!

Ao Prof Dr Angelo Berchieri Jr, professor titular da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, pela indicação das granjas que foram realizadas as coletas das amostras utilizadas neste estudo.

Ao Prof Dr Yung-Fu Chang pesquisador do *Cornell University College of Veterinary Medicine*, pela supervisão durante o estágio de doutorado no exterior, e pela excelente convivência no laboratório durante todo o período de estágio.

Ao Dr. Rafael Antonio Casarin Penha Filho, Jovem Pesquisador da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP Jaboticabal, pela colaboração no delineamento experimental e pelo incansável apoio na correção da escrita dos artigos e tese.

À Profª Drª Regina Celia Candido, pelo apoio, compreensão e amizade durante todo o período que convivemos.

Ao Rubens Eduardo da Silva, Ludmilla Tonani e Solange Aparecida Bocardo desta unidade, pelo apoio técnico e momentos de descontração e amizade.

Ao Dr Leonardo Neves Andrade, pós-doutorando do Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular, pelas discussões científicas, correção de artigos e amizade sincera.

Aos amigos de pós-graduação do LEBEM Renata Galetti, Anelise Ballaben e Natália Columbaro, muito obrigada pelas discussões científicas, amizade, bom humor, excelente convívio e momentos de alegria contagiante que tornaram melhores os dias de trabalho no laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP, pelos esforços para oferecer sempre as melhores oportunidades científicas e acadêmicas.

À Rosana Florêncio, Henrique Theodoro e demais funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela gestão, atenção e gentileza dispensada com toda competência durante toda a pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – projeto nº 2014/14494-8), pelo suporte financeiro ao LEBEM.

À minha família, meus pais Maria Bernadete e José Carlos (in memorian), por toda paciência, carinho, apoio, ensinamentos, alegrias e lembranças. O apoio de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo!

A Deus, por me dar força e disposição todos os dias para me dedicar ao trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A lei da mente é implacável

O que você pensa, você cria;

O que você sente, você atrai;

O que você acredita

Torna-se realidade.

Budá

RESUMO

Ferreira, Joseane Cristina. **Caracterização fenotípica e molecular de enterobactérias resistentes a antimicrobianos isoladas de aves comerciais de granjas do interior do estado de São Paulo**. 2018. 79 F. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas a Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Desde a primeira enzima β -lactamase de espectro estendido (ESBL) detectada, na década de 1980, o número de diferentes enzimas ESBL têm aumentado exponencialmente. Houve também aumento no número de relatos de isolamento de bactérias resistentes presentes em alimentos de origem animal. O objetivo deste estudo foi avaliar enterobactérias de microbiota de frangos comerciais saudáveis, de granjas localizadas no interior do Estado de São Paulo (Brasil), quanto à resistência a antimicrobianos e ao potencial de virulência. Foram avaliadas todas as enterobactérias que apresentaram resistência à cefotaxima e/ou ceftazidima de 200 frangos comerciais para consumo humano. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado por disco de difusão para diferentes classes de antimicrobianos incluindo β -lactâmicos e não β -lactâmicos. Reação em cadeia da polimerase e sequenciamento foram utilizados para a pesquisa de genes codificadores de ESBL, β -lactamases AmpC e determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR). A similaridade genética dos isolados foi caracterizada por eletroforese em campo pulsado (PFGE) e a localização cromossômica ou plasmideal de genes de resistência foi avaliada por I-Ceu I-PFGE ou S1-PFGE. Além disso, experimentos de conjugação, tipagem de plasmídeos, investigação de filogenia e de virulência foram realizados. Em todas as amostras de cloaca coletadas foram identificados *Enterobacteriaceae*, incluindo *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella pneumoniae* resistentes à cefotaxima e/ou ceftazidima. *Salmonella* sp não foi detectada. Foi encontrada ampla diversidade genômica entre todos os isolados classificados entre diferentes tipos de PFGE. Foram detectados diferentes genes codificadores de β -lactamases, a maioria em diferentes plasmídeos, de diversos tamanhos, sendo alguns conjugativos, presentes em diferentes populações bacterianas. Foram identificados isolados de *E. coli* produtores de CTX-M-2, com inserção do gene *bla*_{CTX-M-2} no cromossomo bacteriano. Plasmídeo IncI (ST113/ST114) foi identificado carreando o gene *bla*_{CTX-M-8}. Foram também encontrados os genes codificadores de β -

lactamase, *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-15}, sendo carregados por plasmídeos. Foi identificado gene *bla*_{CMY-2} disseminado por plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade, na população comensal de *E. coli*. Nos isolados que abrigavam gene PMQR, além das resistências às quinolonas, foi observado também resistência a outras importantes classes de antimicrobianos. Genes determinantes de PMQR abrigados em plasmídeos tipo ColE foram encontrados em *E. coli*, *E. fergusonii*, *K. oxytoca* e *K. pneumoniae*. Todas as aves comerciais de granjas localizadas no interior do Estado de São Paulo, incluídas nesse estudo, apresentaram isolados considerados multirresistentes a antimicrobianos e o trato intestinal destes frangos é reservatório dos genes de resistência em enterobactérias da microbiota normal. Além disso, alguns isolados demonstraram alto potencial de virulência, incluindo a capacidade de adesão e invasão em células epiteliais *in vitro*.

Palavras - chave: Frangos, β -lactamases, Bactérias multirresistentes, Plasmídeos, Virulência.

ABSTRACT

Ferreira, Joseane Cristina. **Phenotypical and molecular characterization of antimicrobial resistant enterobacteria isolated from comercial poultry farms in São Paulo State.** 2018. 79 F.Thesis (Doctorate in Biosciences Applied to Pharmacy) School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Since the first detection of extended spectrum β -lactamase (ESBL) enzyme in the 1980s, the number of different ESBL enzymes has been increasing exponentially. The number of reports of resistant isolates present in food of animal origin also increased. The objective of this study was to characterize and identify the phenotype and genotype of antimicrobial resistant enterobacteria isolated from the cloacae of commercial poultry in farms located at the countryside of São Paulo State (Brazil). All enterobacteria presenting cefotaxime and/or ceftazidime resistance from 200 commercial broiler chickens for human consumption were evaluated. Antimicrobial susceptibility testing was performed by disc diffusion for different classes of antimicrobials, including β -lactams and non- β -lactams. The genes encoding ESBL, *ampC* β -lactamases and determinants of plasmid mediated quinolone resistance (PMQR) were screened by polymerase chain reaction and sequencing. Genetic similarity of bacterial isolates was characterized by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and the location of the resistance genes in the chromosome or plasmids was evaluated by I-*CeuI*-PFGE or *S1*-PFGE. Additionally, experiments of conjugation, plasmid typing, phylogeny and virulence characterization were performed. Enterobacteriaceae were identified in all cloacal swab samples, including *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to cefotaxime and/or ceftazidime. *Salmonella* sp. was not detected. High genetic diversity was detected among all isolates, classified into different types of PFGE. Different genes coding for β -lactamases were detected, harbored in diverse plasmids, of different sizes, some were conjugative and were present in different bacterial populations. *E. coli* isolates producing CTX-M-2 were identified, harbouring the *bla*_{CTX-M-2} gene inserted into the chromosome. IncI (ST113/ST114) plasmid was identified carrying the *bla*_{CTX-M-8} gene. The β -lactamase coding genes, *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-15} were also found in plasmids. The gene *bla*_{CMY-2} was found disseminated in different types of plasmid *replicons* in the commensal *E. coli* population. In isolates harbouring PMQR genes, in addition to the quinolones resistance, was observed resistance to other important antimicrobials classes was

observed. PMQR determinant genes harbored in ColE-like plasmids were found in *E. coli*, *E. fergusonii*, *K. oxytoca* and *K. pneumoniae*. All commercial poultry from farms located at São Paulo State, evaluated in this study, carried isolates considered multidrug resistant and the intestinal tract of these chickens is reservoir of resistant genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8} and *bla*_{CTX-M-15} in enterobacteria from the normal microbiota. Moreover, some have demonstrated a high virulence potential, with adhesion and invasion capacity in epithelial cells cultured *in vitro*.

Keywords: Poultry, β -lactamase, Multidrug resistant bacteria, Plasmids, Virulence.

RESUMEN

Ferreira, Joseane Cristina. **Caracterización fenotípica y molecular de enterobacterias resistentes a antimicrobianos aislados de aves comerciales de granjas del interior del Estado de São Paulo**. 2018. 79 h. Tesis (Doctorado en Biociencias Aplicadas a Farmacia) - Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Desde la primera enzima β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) detectada, en la década de 1980, el número de diferentes enzimas BLEE ha aumentado exponencialmente. También, hubo aumento en el número de informes de aislamiento de bacterias resistentes presentes en alimentos de origen animal. El objetivo de este estudio fue evaluar enterobacterias de microbiota de pollos comerciales sanos, de granjas ubicadas en el interior del Estado de São Paulo, Brasil, acerca a la resistencia a antimicrobianos y al potencial de virulencia. Se evaluaron todas las enterobacterias que presentaron resistencia a la cefotaxima y/o ceftazidima de 200 pollos comerciales para el consumo humano. La determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos fue realizada por difusión en disco para diferentes clases de antimicrobianos incluyendo β -lactámicos y no β -lactámicos. La reacción en cadena de la polimerasa y la secuenciación se utilizaron para la investigación de genes codificadores de BLEE, β -lactamasas AmpC y determinantes de resistencia a las quinolonas mediada por plásmidos (PMQR). La similitud genética de los aislados fue caracterizada por electroforesis de campo pulsado (PFGE) y la localización cromosómica o plasmídica de genes de resistencia fue evaluada por I-Ceu I-PFGE o S1-PFGE. Además, se realizaron experimentos de conjugación, tipificación de plásmidos, investigación de filogenia y de virulencia. En todas las muestras de cloaca recogidas se identificaron *Enterobacteriaceae*, incluyendo *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella pneumoniae* resistentes a la cefotaxima y/o ceftazidima. *Salmonella* sp no fue detectada. Se encontró una amplia diversidad genómica entre todos los aislados clasificados entre diferentes tipos de PFGE. Se detectaron diferentes genes codificadores de β -lactamasas, la mayoría en diferentes plásmidos, de diversos tamaños, siendo algunos conjugativos, presentes en diferentes poblaciones bacterianas. Se identificaron aislados de *E. coli* productores de CTX-M-2, con inserción del gen *bla*_{CTX-M-2} en el cromosoma bacteriano. Plásmidos IncI (ST113/ST114) fueron identificados llevando el gen *bla*_{CTX-M-8}. También se encontraron los genes

codificadores de β -lactamasa, *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-15}, siendo transportados por plásmidos. Se identificó el gen *bla*_{CMY-2} diseminado por plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad, en la población comensal de *E. coli*. En los aislados que contenían gen PMQR, además de las resistencias a las quinolonas, se observó también resistencia a otras importantes clases de antimicrobianos. Los genes determinantes de PMQR abrigados en plásmidos tipo ColE se encontraron en *E. coli*, *E. fergusonii*, *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*. Todas las aves comerciales de granjas ubicadas en el interior del Estado de São Paulo, incluidas en este estudio, presentaron aislados considerados multirresistentes a antimicrobianos y el tracto intestinal de estos pollos es reservorio de los genes de resistencia en enterobacterias de la microbiota normal. Además, algunos aislados demostraron un alto potencial de virulencia, incluyendo la capacidad de adhesión e invasión en las células epiteliales *in vitro*.

Palabras - clave: Pollos, β -lactamasas, Bacterias multirresistentes, Plásmidos, Virulencia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Porcentagem dos isolados resistentes aos antimicrobianos testados	31
Figura 2	Dendrograma de similaridade genética obtido por <i>Xba</i> I-PFGE de 19 isolados de <i>E. coli</i> produtores de CTX-M-2	33
Figura 3	Localização do gene <i>bla</i> _{CTX-M-2} em diversos isolados de <i>E. coli</i>	34
Figura 4	Análise quantitativa da aderência e invasão de <i>E. coli</i> em células Caco-2 infectadas com isolados com potencial para ExPEC	60
Figura 5	Imagens confocal da avaliação <i>in vitro</i> de adesão e invasão de isolados de <i>E. coli</i> MDR e <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2 em células Caco-2	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Linhagens bacterianas utilizadas como controle positivo de genes e plasmídeos de resistência avaliados nos experimentos	17
Quadro 2	<i>Primers</i> utilizados na detecção de genes codificadores de β -lactamases	20
Quadro 3	<i>Primers</i> utilizados na detecção de genes de resistência às quinolonas	21
Quadro 4	Função dos genes de virulência avaliados no estudo	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características de isolados de <i>E.coli</i> produtores de CTX-M-8 (<i>bla</i> _{CTX-M-8} IncII/ST113 e IncII/ST114)	37
Tabela 2	Características microbiológicas e moleculares de isolados produtores de CTX-M	40
Tabela 3	Características de <i>E. coli</i> produtores de CMY-2	46
Tabela 4	Características fenotípicas e genotípicas de isolados de <i>E.coli</i> carreando determinantes PMQR	51
Tabela 5	Características fenotípicas e genotípicas de isolados de <i>K. oxytoca</i> , <i>K.pneumoniae</i> e <i>E.fergusonii</i> carreando determinantes de PMQR	53
Tabela 6	Características genotípicas relacionadas com virulência de <i>E. coli</i> MDR	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma (s)
µL	Microlitro (s)
µM	Micromolar (s)
A	Adenina
ACC	<i>Ambles class C</i>
ACT	Gene codificador de AmpC
AFLP	Análise do polimorfismo do comprimento amplificado
AMC	Ampicilina com ácido clavulânico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênico aviário
ATB	Antibiótico (s)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATZ	Aztreonam
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
bla	Codificador de β-lactamase
BLAST	<i>Basic local alignment search tool – Translated query -</i>
BES	<i>Brazil extended spectrum</i>
C	Citosina
CAZ	Ceftazidima
CC	Complexo clonal
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHL	Cloranfenicol
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMY	<i>Active on cephamycins</i>
crDNA	DNA cromossômico
CTX	<i>Active on cefotaxime</i>
CVMP	<i>Committee for Medicinal Veterinary Products</i>
DACTB	Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
DDST	<i>Double disc synergism test</i>
DHA	<i>Discovered Dhahran, Saudi Arabia</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico

dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
EC	Tris, NaCl, EDTA, deoxicolato de sódio, Na lauryl sacosil e Brij 58
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EFT	Ceftiofur
EGM	Elemento genético móvel
EMEA	<i>European Medicines Evaluation Agency</i>
ENR	Enrofloxacin
ESBL	<i>Extended Spectrum β-Lactamase</i>
ETP	Ertapenem
ES	EDTA, Sarcosil e água
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênico extra intestinal
EUA	Estados Unidos da América
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEP	Cefepime
FFC	Florfenicol
fimH	Fimbria tipo I
FOX	Cefoxitina
G	Guanina
g	Grama (s)
<i>gyrB</i>	Subunidade da girase
GEN	Gentamicina
GES	<i>Guiana-extended spectrum</i>
GIPEA	Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos
HCl	Ácido clorídrico
Inc	Grupo de incompatibilidade
Int I1	Integrase
IS	Sequência de inserção
Kb	Kilobase (s)
Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
L	Litro (s)
LB	<i>Luria Bertani</i>
LEBEM	Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular

LEV	Levofloxacin
LN	Lincomicina/neomicina
LS	Lincomicina/spectiomicina
M	Molar (es)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MBL	Metalo- β -lactamase
NMEC	<i>E. coli</i> meningite neonatal
MDR	Multidroga resistente
mg	Miligrama (s)
MH	Muller Hinton
min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
mM	Milimolar (es)
mm	Milímetro (s)
MOX	<i>Active on moxalactam</i>
n	Número
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NAL	Ácido nalidixico
ND	Não determinado
ng	Nanograma (s)
OXA	<i>Active on oxacillin</i>
pampC	<i>ampC</i> plasmideal
pb	Pares de base
PBRT	Tipagem de replicon baseado em PCR
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pDNA	DNA plasmideal
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
pH	Potencial de hidrogênio
PIV	Solução tamponante de Tris + HCl
pMLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i> para plasmídeos
pmol	Picomol (es)
PMQR	Resistência às quinolonas mediada por plasmídeos

PREBAF	Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e Resistência Bacteriana em Frangos
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RCR	<i>Rolling – Circle Replication</i>
rep	<i>Replicons</i>
rRNA	RNA ribossômico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo (s)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEPEC	<i>E.coli</i> associada à sepse
SHV	<i>Sulphydryl reagent variable</i>
SP	Estado de São Paulo
SPM	São Paulo metalo- β -lactamase
SS	Ágar <i>Salmonella-Shigella</i>
SSC	Citrato de sódio, Cloreto de sódio
ST	<i>Sequence Typing</i>
STX	Sulfametoxazol-trimetorpim
T	Timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris, ácido bórico, EDTA
TE	Tris, EDTA
TEM	Temoneira
TET	Tetraciclina
Tris	Hidroximetil amino metano
TSA	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
TZP	Ticarcilina/Piperacilina
U	Unidade (s)
UFC	Unidade formadora de colônia
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênica
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
W-PCR	Água para PCR

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
®	Marca registrada
™	Trademark
°C	Graus Centígrados
X	Vezez
±	Mais ou menos
>	Maior
≥	Maior ou igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
~	Aproximadamente
+	Mais
=	Igual
α	Alfa
β	Beta
Y	Citosina ou Timina
R	Adenina ou Guanina
B	Citosina, Timina ou Guanina
K	Timina ou Guanina
xg	Força centrífuga

1

¹ A tese e as referências bibliográficas estão apresentadas segundo "Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP" 3ª Edição Revisada, Ampliada e Modificada, 2016, parte I (ABNT) <http://dx.doi.org/10.11606/9788573140606>.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Resumen	v
Lista de figuras	vii
Lista de quadros	viii
Lista de tabelas	ix
Lista de abreviaturas e siglas	x
Lista de símbolos	xiv
1. Introdução	1
1.1. Bactérias multirresistentes	3
1.2. Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos	4
1.2.1. CTX-M	6
1.3. Mecanismos de resistência às quinolonas e genes plasmídeos	7
1.4. Clones	8
1.5. Elementos Genéticos Móveis	8
1.5.1. Plasmídeos	8
1.5.2. Integron	10
1.5.3. Sequência de Inserção	10
1.6. Animais de produção como reservatórios de bactérias resistentes	11
1.7. Virulência	11
2. Objetivos	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. Material e métodos	15
3.1. Coleta de amostras	15
3.2. Amostras bacterianas	15
3.2.1. Critério de seleção	15
3.3. Armazenamento das enterobactérias	15
3.4. Sensibilidade aos agentes antimicrobianos	16
3.5. Linhagens controle	17

3.6.	Detecção dos genes de β -lactamase e determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR) por PCR	18
3.6.1.	Extração de DNA genômico	18
3.6.2.	Condições da PCR	19
3.7.	Determinação de ambiente genético dos genes produtores de ESBL	21
3.8.	Eletroforese em campo pulsado	21
3.9.	Caracterização de Grupos Filogenéticos para isolados de <i>E. coli</i>	23
3.10.	Sequenciamento de produto de PCR	23
3.11.	Tipagem por <i>multilocus sequence typing</i>	24
3.12.	Pesquisa de plasmídeo	24
3.12.1	Tipagem dos plasmídeos por grupos de incompatibilidade	24
3.12.2	<i>Plasmid multilocus sequence typing</i>	24
3.12.3	Caracterização de plasmídeos ColE	24
3.12.4.	Avaliação do DNA plasmideal	25
3.13.	Determinação da localização do gene de resistência de interesse	25
3.13.1.	Plasmideal	25
3.13.2.	Cromossômica	26
3.14.	Experimentos de Conjugação	26
3.15.	Determinação da virulência dos isolados	27
3.15.1.	Pesquisa de genes de virulência	27
3.15.2.	Seleção de isolados com potencial de virulência de ExPEC	27
3.15.3.	Cultivo celular.....	28
3.15.4.	Avaliação do potencial de adesão a células epiteliais.....	28
3.15.5.	Ensaio de microscopia de fluorescência	29
3.15.6.	Ensaio de invasão a células epiteliais	29
4.	Resultados e Discussão	30
4.1.	Gêneros e espécies isolados	30
4.2.	Sensibilidade aos agentes antimicrobianos	30
4.3.	Identificação de genes de resistência	31
4.4.	Detecção de <i>bla</i> _{CTX-M-2} no cromossomo em diversos isolados de <i>E. coli</i>	32
4.5.	Plasmídeos conjugativos IncI1/ST113 e IncI1/ST114 carreando <i>bla</i> _{CTX-M-8} em isolados de <i>E. coli</i>	35

4.6.	Avaliação e caracterização de plasmídeos de interesse em população não clonal de isolados de <i>Enterobacteriaceae</i> multirresistentes	37
4.7.	Diversidade de plasmídeos carreando <i>bla</i> _{CMY-2} em <i>E. coli</i> multirresistentes a antimicrobianos	44
4.8.	Identificação e caracterização de determinantes da resistência às quinolonas mediada por plasmídeos.....	48
4.9.	Potencial de virulência de <i>E. coli</i> comensais multirresistentes	55
5.	Conclusões.....	64
6.	Referências.....	66

1. Introdução

Atualmente, o Brasil ocupa a segunda posição mundial em produção de alimentos de origem avícola e, desde 2006, a carne de frango é o produto de origem animal com o maior volume de exportações. O crescimento da avicultura brasileira se deve à intensa organização da atividade desde a década de 1960. Este crescimento tem sido acompanhado pela evolução dos conhecimentos, principalmente ligados ao bem-estar, à sanidade animal e à produção de alimentos seguros para consumo. A avicultura moderna explora aspectos como a potencialização da criação em pequeno espaço, o que pode favorecer a introdução e a disseminação de patógenos, que poderão permanecer no ambiente por tempo indeterminado. A disponibilização de antimicrobianos e quimioterápicos trouxe grande contribuição ao setor avícola mundial e é considerada ferramenta importante em qualquer atividade avícola rentável, para realizar o controle e prevenção de infecções.

Em 1948, a vitamina B₁₂ foi isolada e caracterizada como um fator de proteína animal (APF, do inglês *animal protein factor*), ingrediente necessário para balancear rações de suínos e aves. Entretanto, pesquisas posteriores mostraram que vários ingredientes da ração, incluindo micélio seco de certos fungos, atuavam como fatores de crescimento mais potentes que a vitamina B₁₂. Além disso, foi demonstrado que o fator de crescimento presente no micélio fúngico era um antibiótico. As evidências da atuação de antimicrobianos, em baixa dosagem, como promotores de crescimento foram se sucedendo, de tal forma que, em 1951, a organização *U.S Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso de produtos antimicrobianos na ração animal sem prescrição veterinária ¹.

O uso de antimicrobianos na indústria avícola está associado a três situações: tratamento de animais doentes, terapia preventiva a fim de evitar infecções e promotor de crescimento. A utilização de antibiótico como promotor de crescimento representa a maior parcela do uso de antimicrobianos em animais, mas mundialmente há pouco estudo sobre quais antimicrobianos e as quantidades totais destes que são usados em animais. Diversos trabalhos demonstram que o aumento de resistência bacteriana aos antimicrobianos está fortemente relacionado com a medicina humana, devido ao excesso de uso ou uso inadequado de antimicrobianos ^{2; 3; 4}. Adicionalmente, existem

várias evidências que enterobactérias comensais e patogênicas podem ser transferidas dos animais ao homem por cadeia alimentar ou por contato direto, sendo assim a microbiota animal é considerada potencial reservatório de bactérias abrigando genes de resistência a antimicrobianos ⁵.

Agentes antimicrobianos utilizados na produção avícola geralmente são administrados na ração ou na água de consumo das aves. Devido à sua praticidade de uso e eficácia, os antimicrobianos contribuíram para o rápido crescimento da indústria avícola. A escala de produção de aves aumentou exponencialmente no século passado, mudando de pequenos produtores a grandes indústrias, e assim também aumentou o uso de antimicrobianos na indústria de produção de proteína animal ⁶.

No Brasil, os aditivos antimicrobianos são usados há mais de 50 anos e têm sido ferramentas importantes no campo veterinário, pois além de aumentar o ganho de peso animal, melhoram a conversão alimentar, bem como diminuem a mortalidade ⁷.

Vários países possuem legislação rigorosa para o controle de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. Nos Estados Unidos o controle é realizado pelo FDA. Em 2012, o FDA aprovou uma nova legislação que restringe o uso de cefalosporinas em animais de produção, incluindo frangos, com o objetivo de reduzir o uso profilático de antimicrobianos na produção animal e também a disseminação de bactérias⁸. Na União Européia o registro de produtos farmacêuticos e *premises* com antimicrobianos são realizados pela *European Medicines Evaluation Agency* (EMA) que atende o *Committee for Medicinal Veterinary Products* (CVMP). No Brasil o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é responsável pela autorização e normatização do uso de medicamentos veterinários e também pela fixação e controle de resíduos de medicamentos em tecidos e produtos de origem animal ⁹.

A legislação brasileira por meio de portarias ministeriais, como a nº 193, licencia o uso de antimicrobianos de uso veterinário e considera que “seu uso adequado deve proporcionar a eficácia aos produtos destinados à saúde animal e à segurança para a saúde pública, mas os antimicrobianos utilizados em terapêutica devem ser evitados na indicação de aditivos alimentares, promotores de crescimento ou como conservantes de alimentos para animais, sendo vedado o uso de cloranfenicol, penicilinas, tetraciclina e sulfonamidas sistêmicas” ¹⁰. A portaria de número 448 “proíbe a fabricação, importação, comercialização e emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, rações e aditivos alimentares contendo cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona, em animais cujos produtos sejam destinados a consumo humano” ¹¹.

Em 2002 foi criado o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e Resistência Bacteriana (PREBAF) em isolados de carcaça de frangos congelados no Brasil. As amostras foram coletadas entre 2004 a 2006, e em 2008 foi publicado o relatório. Neste consta o isolamento de *Salmonella* spp em 4% das amostras, sendo considerado grande risco a saúde pública. *Enterococcus* sp. foi isolado em 100% das amostras ¹²

Em 2002, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reuniu especialistas para proporem diretrizes para a prevenção e controle da resistência microbiana e uso racional de antimicrobianos. Estas diretrizes focalizavam alvos específicos como: pacientes e comunidade em geral, profissionais de saúde, serviços de saúde, laboratórios de microbiologia, uso de antimicrobianos em veterinária, uso de antimicrobianos na agricultura e órgãos reguladores. O resultado deste trabalho orientou ações desenvolvidas pela Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos (GIPEA) e apontou a necessidade de implantação de uma rede de monitoramento da resistência microbiana. A meta estabelecida, para o uso racional de antimicrobianos em veterinária em 2002, foi ampliar o conhecimento do impacto em saúde humana de antimicrobianos usados na veterinária. As principais ações propostas foram: estimular programas de monitoramento de consumo de antimicrobianos e da resistência microbiana, promover a vigilância e epidemiologia do uso de antimicrobianos, revisar a portaria nº 193 e criar uma regulamentação em uso racional de antimicrobianos em veterinária. Em 2005 por meio da portaria Nº 1.133/GM de 6 de julho, foi criado pela ANVISA, o Comitê Técnico Assessor para Uso Racional de Antimicrobiano e Resistência Microbiana ¹³.

1.1. Bactérias Multirresistentes

O termo multirresistente é definido por vários autores e há usos conflitantes deste termo na literatura ¹⁴. Existem atualmente diferentes classificações para o termo e foi sugerida uma padronização internacional para bactérias hospitalares clinicamente e epidemiologicamente importantes. As bactérias podem ser classificadas em (i) multidroga resistentes (MDR), isolados não sensíveis (resistente ou intermediário) a pelo menos um antibiótico em três ou mais classes/categorias, (ii) extremamente resistentes às drogas (XDR), isolados não sensíveis a pelo menos um antibiótico em quase todas as classes, restando sensibilidade somente a uma ou duas classes ou (iii)

pan-droga resistentes (PDR), definidas como não sensíveis a todos os antibióticos de todas as classes ¹⁵. Outros termos também têm sido usados para definir fenótipo de bactérias multirresistentes, entre eles estão incluídos “co-resistência”, “resistência-cruzada” e “resistência pleiotrópica”. A definição de “co-resistencia” é caracterizada como a presença de diferentes mecanismos de resistência codificada por mutações ou por aquisição de genes. Resistência-cruzada ocorre quando a presença de um mecanismo de resistência específico, codificado por mutações ou por aquisição de genes que afeta antibióticos de uma mesma classe. Resistência pleiotrópica é definida quando um mecanismo de resistência, geralmente inespecífico, codificado por mutação ou aquisição de genes promove a resistência a diferentes classes de antimicrobianos ¹⁶.

Bactérias multirresistentes frequentemente abrigam múltiplos elementos genéticos móveis (EGM) como sequências de inserção, integrons, transposons e plasmídeos, que conferem fenótipos de resistência a antimicrobianos. Uma linhagem bacteriana bem-sucedida é extremamente eficiente na disseminação destes elementos por duas principais razões. Primeiramente, porque todos os elementos de resistência são transmitidos verticalmente em virtude da propagação da linhagem, causando sua crescente prevalência. Em segundo lugar, a linhagem terá múltiplas oportunidades de atuar como doadora e transferir os elementos de resistência horizontalmente para outras linhagens, espécies ou gêneros bacterianos ¹⁷.

A alta prevalência de genes de resistência em animais de produção ocorre essencialmente pela combinação de dois fatores: pela seleção de isolados resistentes pelo uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, pela presença de EGM, disseminando genes de resistência entre diferentes gêneros bacterianos, que persistem no ambiente ¹⁸.

1.2. Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos

Atualmente, dentre todos os antimicrobianos disponíveis, o grupo dos β -lactâmicos é empregado em aproximadamente 60% das terapias da medicina humana no mundo. A eleição destes antimicrobianos para o controle de diferentes infecções bacterianas se dá pela sua ampla maleabilidade e versatilidade química. O emprego destes medicamentos em terapias ocorre desde a década de 1940, com o β -lactâmico de primeira classe (penicilina) e, junto à sua popularidade também ocorreu o aumento na resistência a este antimicrobiano. A resistência aos β -lactâmicos em bactérias gram-

negativas depende principalmente da produção de enzimas β -lactamases e de hiperexpressão de sistemas de efluxo¹⁹.

O trato gastrointestinal dos animais vem sendo descrito como importante reservatório de bactérias comensais multirresistentes produtoras de β -lactamases além de ser potencial reservatório de bactérias patogênicas capazes de adquirir genes de resistência^{20; 21; 22}.

As primeiras β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) foram descritas nos anos 80 e foram identificadas como mutações em genes plasmídeos codificadores de enzimas TEM e SHV de espectro restrito com a substituição de um ou mais aminoácidos. A epidemiologia das ESBLs tem mudado rapidamente com o surgimento de diversos tipos e subtipos de enzimas como, por exemplo, do grupo CTX-M^{19; 23}.

As bactérias produtoras de ESBLs são resistentes às cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações, bem como ao aztreonam, mas não à cefoxitina e aos carbapenêmicos. Diferentes tipos de ESBLs têm sido reportados e alguns, como CTX-M, representam problema emergente em saúde humana e animal, sendo relatados como “pandemia CTX-M”^{23; 24}.

Nas últimas décadas, o aumento na prevalência de *E. coli* produtora de ESBL dentre os isolados clínicos tem causado grande preocupação, pois este mecanismo de resistência está implicado na falha terapêutica para diversas doenças infecciosas^{23; 25; 26}.

Enterobacteriaceae produtoras de ESBL tornaram-se o principal problema de saúde pública, no que diz respeito às infecções nosocomiais e comunitárias, devido à rápida disseminação dessas enzimas e o surgimento constante de novas variantes. No Brasil, a produção de ESBL em *Enterobacteriaceae* também é alarmante, uma vez que variantes do tipo TEM, SHV, CTX-M, OXA, BES, GES e VEB têm sido descritas. As enzimas pertencentes à família CTX-M são predominantes na América do Sul²⁷. A prevalência de enterobactérias produtoras de ESBL colonizando o trato intestinal de animais de produção, aparentemente saudáveis, incluindo frangos, tem aumentado mundialmente¹⁸.

β -lactamases do tipo AmpC são cefalosporinases clinicamente importantes codificadas por genes cromossômicos em muitas enterobactérias. Estas enzimas conferem resistência à cefalotina, cefazolina, cefoxitina, à maioria das penicilinas e combinações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamase. As enzimas AmpC são induzíveis e podem ser expressas em altas concentrações devido a mutações no gene,

caracterizando a hiperexpressão. Nestes casos, a hiperexpressão confere resistência às cefalosporinas de amplo espectro incluindo cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona.²⁸

Genes que codificam as β -lactamases AmpC carregados por plasmídeos são descritos desde 1989^{29; 30}. Os genes plasmideais estão disseminados mundialmente tanto em bactérias isoladas de pacientes hospitalizados quanto em pacientes da comunidade e têm sido relatados mais frequentemente em enterobactérias que não produzem β -lactamases AmpC cromossômicas²⁸.

Genes *ampC* mobilizados por plasmídeos, *ampC* plasmideal (*pampC*), são cada vez mais prevalentes em *E. coli*, *Klebsiella* spp, e *Salmonella* spp, mas ainda são menos frequentes que os plasmídeos que carregam genes de ESBLs³¹. Bactérias como *E. coli* e *Salmonella* carregando plasmídeos com gene *ampC* têm sido isoladas de animais de produção em diversos países. No Brasil, gene *ampC* mediado por plasmídeos são raramente relatados em isolados clínicos de amostras humanas^{4; 18; 29}.

1.2.1. CTX-M

A primeira identificação de β -lactamases CTX-M ocorreu simultaneamente na Europa e na América do Sul, no início do ano de 1989. Esta enzima, cefotaximase, carregada por plasmídeo foi identificada em isolado de *E.coli* em Munique na Alemanha e recebeu este nome devido à sua atividade hidrolítica à cefotaxima^{32; 33}.

A alta prevalência de genes *bla*_{CTX-M} em *Enterobacteriaceae*, particularmente em *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*, tem sido relatada mundialmente. No entanto, atualmente a disseminação de plasmídeos carregando estes genes de resistência não é restrita às enterobactérias; a presença destes genes em bactérias não fermentadoras de glicose como *Pseudomonas* e *Acinetobacter* também foi descrita^{34 23; 35}.

Enterobactérias produtoras de CTX-M têm sido isoladas não somente de amostras clínicas de humanos como também em animais e do ambiente^{18; 36}. O gene *bla*_{CTX-M} pode ser mobilizado por diferentes EGM, incluindo plasmídeos, transposons e integrons^{17; 23; 37}. Bactérias produtoras de CTX-M frequentemente apresentam resistência a outras classes de antimicrobianos como aos aminoglicosídeos e às fluoroquinolonas. Este fato facilita a seleção de isolados que apresentam multirresistência a antimicrobianos^{16; 38}.

1.3. Mecanismos de resistência às quinolonas e genes plasmideais

A introdução de fluoroquinolonas em terapias clínicas ocorreu na década de 1980. A vantagem da administração oral e sua atividade contra microrganismos gram-negativos contribuíram para a frequente indicação desta classe de antimicrobiano para o tratamento de infecções causadas por *E. coli*, *Salmonella* e outras enterobactérias, tanto em humanos como em animais de produção. Entretanto, a ampla utilização das fluoroquinolonas para tratamento de infecções hospitalares, infecções na comunidade e na produção avícola, têm contribuído para a seleção de bactérias resistentes a esta classe de antimicrobiano ³⁹.

Os mecanismos de resistência às quinolonas podem ter origem cromossômica e/ou plasmideal ^{40; 41}. A resistência cromossômica pode ser resultado da diminuição da permeabilidade da membrana celular relacionada com a perda de porinas, aumento da expressão de bombas de efluxo que ocorrem naturalmente ⁴², ou por mutações pontuais de nucleotídeos nos genes *gyrA*, *gyrB* e *parC*, *parE*, que codificam as enzimas alvo das quinolonas, DNA girase e topoisomerase IV, respectivamente. A resistência de origem plasmideal possui diferentes determinantes descritos: genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* e *oqxAB*. Desde 1998, o surgimento de plasmídeos que medeiam resistência às quinolonas (PMQR) tem sido reportado. Sozinhos, estes plasmídeos conferem baixa resistência às fluoroquinolonas, mas podem potencializar os mecanismos de resistência codificados no cromossomo. O primeiro plasmídeo descrito contendo genes de resistência às quinolonas codifica proteínas chamadas Qnr, cuja função é proteger as enzimas bacterianas DNA girase e topoisomerase IV da ação das quinolonas ^{41 43}.

Os principais determinantes PMQR são os genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*) ⁴⁴. Além dos genes *qnr*, os genes *qepA*, *aac(6')-Ib-cr* e *oqxAB* têm sido frequentemente identificados em humanos ⁴⁴.

A prevalência de gene *qnrB* é mais elevada que a de outros genes *qnr* em isolados de *Enterobacteriaceae* ⁴⁵. O gene *qnrB19* tem sido reportado mundialmente em isolados de *Enterobacteriaceae* coletados de humanos saudáveis, infecções clínicas e animais de produção ^{46; 47; 48}.

Outro mecanismo plasmideal foi descoberto em 2005, por Robicsek e colaboradores ⁴⁹. Este consiste na presença de uma variação do gene *aac(6')-Ib*, nomeado como *acc(6')-Ib-cr* ("cr" do inglês *ciprofloxacin resistance*). Esta variante

codifica uma acetiltransferase que inibe a ação de aminoglicosídeos e diminui a sensibilidade à ciprofloxacina e norfloxacina por reação de N-acetilação ⁴⁹.

1.4. Clones

O termo clone deve ser usado para descrever bactérias que, embora possam ser isoladas de forma independente, a partir de fontes locais e épocas diferentes, ainda conservam alguma identidade fenotípica e genotípica demonstrando a origem comum. Essa explicação comumente se aplica após a tipagem epidemiológica de bactérias multirresistentes encontradas em vários locais com características iguais ou altamente semelhantes ¹⁷.

Entre os métodos de tipagem epidemiológica ou genotipagem bacteriana mais comuns estão a PCR *fingerprinting*, a análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), a eletroforese em campo pulsado (PFGE), *multilocus sequence typing* (MLST) e *multiple-locus variable tandem repeat number analysis* (MVLA) ¹⁷.

1.5. Elementos Genéticos Móveis

Atualmente, estudos envolvendo *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, isolados de aves e de humanos, tem demonstrado características similares entre os isolados, especialmente aqueles relacionados aos EGM. Esses estudos também têm sugerido que a disseminação de isolados resistentes a antimicrobianos pela cadeia alimentar pode contribuir para o aumento do número de infecções ou colonização por estas bactérias em humanos ^{36; 50}.

1.5.1. Plasmídeos

Plasmídeos são DNA extracromossômico auto replicante. A maioria deles confere fenótipos bacterianos selecionáveis pelo uso de antimicrobianos, devido à presença de genes de resistência. A identificação e a classificação dos plasmídeos geralmente são baseadas em características genéticas que estão presentes e são universais, especialmente o controle da replicação. Em 1971, Datta e Hedges propuseram um esquema de classificação de plasmídeos com base na estabilidade dos

mesmos durante a conjugação, fato chamado incompatibilidade de plasmídeos. Incompatibilidade é a característica que plasmídeos relacionados compartilham devido apresentarem o mesmo controle de replicação (*replicon*). Incompatibilidade pode ser definida como incapacidade de dois plasmídeos relacionados se propagarem de forma estável na mesma linhagem celular, desta forma somente plasmídeos compatíveis (que apresentarem diferentes controles de replicação) podem ser transferidos ou mantidos na célula receptora ⁵¹.

Em 1988, Couturier e colaboradores desenvolveram um método para a identificação da maioria dos *replicons* de plasmídeos circulantes entre as enterobactérias. Este método foi baseado na hibridação com 19 sondas de DNA que reconhecem diferentes *replicons* básicos. As metodologias de conjugação e hibridação não podem ser facilmente aplicadas em laboratórios de rotina, com grande número de amostras bacterianas, pois a dificuldade técnica limita o número de amostras que podem ser avaliadas ao mesmo tempo. Inicialmente, a detecção de plasmídeos baseada em PCR foi elaborada com base em sequências publicadas, e é uma técnica de maior viabilidade em grande escala, no entanto se limitava aos plasmídeos IncP, IncN, IncW e IncQ ^{52; 53}.

A necessidade de rastreamento de plasmídeos que conferem resistência a drogas levou ao desenvolvimento de método de tipagem por PCR do grupo de incompatibilidade (Inc) dos diferentes tipos de *replicons* (rep) presentes nos plasmídeos. Neste método, 18 pares de *primers* foram desenhados para realizar 5 PCRs multiplex e 3 PCRs simples reconhecendo os *replicons* FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Ig, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, e FIIA, representando a maioria dos grupos de incompatibilidade de plasmídeos circulantes entre as enterobactérias ⁵⁴.

O principal mecanismo de disseminação e aquisição de genes de resistência aos antimicrobianos em *Enterobacteriaceae* tem sido atribuído à transferência horizontal de EGM, especialmente plasmídeos carregando estes genes ⁵⁰.

Muito frequentemente múltiplos determinantes genéticos que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos podem ser identificados no mesmo plasmídeo, conferindo vantagem adaptativa e seletiva à bactéria quando vários antimicrobianos são administrados simultaneamente ⁵⁰.

1.5.2. Integron

Integrans são EGM que podem capturar genes por recombinação sítio específica, mobilizar e expressar genes que estão contidos em EGM denominados de genes cassette^{55; 56}. Os integrans podem ser classificados em três grupos de acordo com a identidade do aminoácido do gene da enzima integrase presente. São determinados como classe I, II e III. O integron de classe I é amplamente distribuído entre bacilos gram-negativos. Um típico integron de classe I possui uma região 5' conservada (5'-CS), uma região variável e uma região 3' conservada (3'-CS). A região 5'-CS consiste de genes que codificam a integrase (*intI*), o sítio adjacente promove a inserção de genes capturados (*attI*), e uma região promotora (Pc). A região 3'-CS geralmente consiste de um gene *qac* parcialmente deletado (*qacEΔI*) ligado ao gene *sul* que conferem resistência a antisépticos e sulfonamida, respectivamente. Integron de classe I tem um papel muito importante na aquisição, manutenção e disseminação de genes codificadores de β-lactamases^{57; 58}.

1.5.3. Sequências de Inserção

Sequências de inserção ou *insertion sequences* (IS) são os menores elementos de transposição, com tamanhos inferiores a 2,5 kb. Possuem a capacidade de transposição independente, dentro de um mesmo genoma bacteriano, podendo causar mutações ou rearranjo do genoma⁵⁹. Possuem três funções na bactéria: codificar uma transposase, fornecer promotores para ativar genes ou aumentar sua expressão e mover genes entre integrans, transposons, plasmídeos e cromossomos, aumentando assim a oportunidade de um determinante de resistência ser transferível. Muitas sequências de inserção estão envolvidas na mobilização de diversos genes de resistência a antimicrobianos⁶⁰.

Muitas plataformas genéticas estão associadas à manutenção e mobilização do gene *bla*_{CTX-M}, especialmente *ISEcpI* e *ISCRI*, sendo *ISCRI* particularmente importante na disseminação do gene *bla*_{CTX-M-2}^{61; 62}.

1.6. Animais de produção como reservatórios de bactérias resistentes

A transmissão de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL de pessoa para pessoa tem sido demonstrada em ambientes hospitalares, comunitários e domésticos. A colonização intestinal de humanos por bactérias resistentes a antimicrobianos sugere que este órgão tem papel importante como reservatório participando na manutenção e disseminação destas bactérias ^{63; 64; 65}.

Os animais, em muitos países europeus, principalmente animais de produção (ex. aves de corte, suínos e bovinos) são relatados de forma crescente como importantes reservatórios de bactérias resistentes produtoras de ESBL (TEM, SHV, CTX-M, PER) e de AmpC (CMY, DHA-1, ACT-1) ^{21; 66}. Também houve aumento no número de relatos de isolamentos de bactérias resistentes presentes em alimentos de origem animal ⁶⁷. Os genes ESBL mais comuns, circulantes entre os animais de produção são os que codificam as enzimas CTX-M. A variante AmpC β -lactamase mais detectada tem sido a CMY-2 ⁶⁸. Em animais de produção, bactérias produtoras de ESBL têm sido mais isoladas na Europa, enquanto as produtoras de AmpC são particularmente mais comuns na América do Norte. A presença de bactérias produtoras de CTX-M-2 em humanos é reportada com grande frequência em diversos países. Bactérias que possuem genes que codificam esta enzima em animais de produção foram observadas no Japão desde 1999 e posteriormente, em outros países. No entanto, atualmente a prevalência destes genes tem aumentado e muitas vezes características comuns são compartilhadas entre isolados de humanos e de animais ²¹.

1.7. Virulência

A maioria dos isolados de *E. coli* são considerados bactérias comensais encontradas nos tratos gastrointestinais de humanos e animais. No entanto, entre estas bactérias, um importante grupo denominado *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC, do inglês extraintestinal pathogenic *E. coli*), carrega genes de virulência específicos e possuem a capacidade de sobreviver fora do ambiente intestinal ⁶⁹. Essas bactérias podem causar infecções e receber diferentes definições, dependendo da habilidade de causar doenças extraintestinal em locais específicos, tal como *E. coli* uropatogênica (UPEC) capazes de colonizar o trato urinário causando cistite e pielonefrite, podendo levar a um quadro de uroseps ⁷⁰. Há estimativa de que 130 a 175 milhões de infecções

do trato urinário ocorra a cada ano no mundo e destas, 80% são causadas por isolados considerados ExPEC ⁷¹. *E. coli* causando meningite neonatal (NMEC) pode causar severas lesões neurológicas e causar mortalidade entre 20 a 40% de recém-nascidos infectados ⁷². *E. coli* associada à sepse (SEPEC) é mais comum em pacientes que permanecem por longo tempo hospitalizados e desenvolvem quadros agravados pela sepse. Estas infecções são mais difíceis de combater quando os isolados apresentam resistência aos antimicrobianos associada à alta virulência bacteriana ⁷³. Infecções causadas por ExPEC são comumente consideradas infecções oportunistas ⁷⁴. Também podem ser classificadas de acordo com o hospedeiro como *E. coli* patogênica aviário (APEC), causando colibacilose, também pode colonizar o trato respiratório de aves e causar aerosaculite, com o desenvolvimento de sepse e infecção generalizada. Surto de APEC podem causar a mortalidade de até 20% dos lotes de aves e uma elevada perda na produção ⁷⁵.

O número de infecções causadas por ExPEC está aumentando em todo o mundo, ocasionando sérios problemas na saúde pública ⁷⁶. ExPEC podem adquirir diferentes genes de resistência a antimicrobianos, aumentando a capacidade de sobrevivência e o risco de disseminação para a saúde humana, além de reduzir as opções terapêuticas em infecções ⁷⁷. Alguns fatores de virulência são comuns aos isolados de ExPEC tanto em animais como humanos e permitem que as bactérias possam colonizar, invadir e causar infecções fora do trato gastrointestinal ⁷⁸. Determinados fatores de virulência são mais frequentes em grupos específicos de ExPEC, tais como Tsh (temperature sensitive hemagglutinin) em APEC, cápsula K1 em NMEC e Sat (secreted autotransporter toxin) em UPEC. Importante fator de virulência está na expressão de adesinas, o que pode auxiliar na adaptação bacteriana a diferentes tecidos hospedeiros. No entanto, algumas adesinas não são ExPEC específicas, como as fimbrias de tipo I (*fimH*) que estão presentes em aproximadamente 95% dos isolados de *E. coli* ⁷⁹.

Estudos têm encontrado semelhanças entre os genes de virulência de isolados de ExPEC humanos e de frangos e sugerem que os produtos de origem avícola podem servir como reservatório e causar infecções em humanos ^{80; 81; 82}. Bactérias podem ser transmitidas pelo consumo de carne ou através da contaminação ambiental com fezes ⁸³. Fator importante a ser ressaltado é o uso intensivo dos antimicrobianos no tratamento e na profilaxia dos animais de produção, o que pode selecionar isolados com genes associados à virulência e multirresistência aos antimicrobianos ⁸⁴. Estes isolados podem se disseminar rapidamente em diversos ambientes ^{81; 85}. As infecções por isolados

multirresistentes apresentam alto custo para a saúde pública ⁸⁶. Há décadas, ExPEC eram altamente sensíveis a antimicrobianos, mas a partir de 2000, esses isolados emergiram com importante resistência a diversas classes de antimicrobianos, como cefalosporinas e fluoroquinolonas ⁷⁶.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Avaliar enterobactérias de microbiota de frangos comerciais saudáveis, de granjas localizadas no interior do Estado de São Paulo, quanto à resistência a antimicrobianos e ao potencial de virulência.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar a presença de enterobactérias resistentes à cefotaxima (CTX) e/ou ceftazidima (CAZ) e identificar os gêneros e espécies envolvidos
- Determinar o perfil de sensibilidade dos isolados de *Enterobacteriaceae* coletados de frangos
- Determinar genes de resistência codificadores de β -lactamases
- Avaliar a presença de genes *bla*_{CTX-M} em isolados de *E. coli* e caracterizar a localização destes em plasmídeos ou cromossomo
- Avaliar a presença de genes *bla*_{CMY-2} e determinar a diversidade de plasmídeos carreadores
- Identificar determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR) em isolados de *Enterobacteriaceae*
- Avaliar o potencial de ExPEC de isolados multirresistentes selecionados e determinar a capacidade de adesão e invasão em células Caco-2

3. Materiais e métodos

3.1. Coleta de amostras

Foram coletados 200 suabes cloacais de frangos de corte. As coletas foram realizadas em duas granjas avícolas de produção comercial, localizadas no interior do Estado de São Paulo.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus USP de Ribeirão Preto, protocolo número 12.1.248.53.7.

3.2. Amostras bacterianas

3.2.1. Critério de seleção

Os suabes cloacais foram semeados em duas placas contendo meio de cultura ágar Mac Conkey (Oxoid), acrescidas de antimicrobianos, uma contendo cefotaxima (MC-CTX) na concentração 1µg/mL, e a outra contendo ceftazidima (MC-CAZ) também na concentração 1µg/mL. Adicionalmente, o material foi semeado em placa contendo meio de cultura Ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (Oxoid), sem antibiótico. As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C, com incubação adicional à temperatura ambiente por mais 24 horas.

As amostras bacterianas foram transferidas para placas de isolamento primário contendo o meio de cultura ágar Mac Conkey (Oxoid), para posterior identificação.

As amostras foram identificadas no Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LEBEM) utilizando testes bioquímicos convencionais⁸⁷ e confirmadas pelo sistema API 20 E[®] (bioMérieux) por método enzimático e colorimétrico.

3.3. Armazenamento das enterobactérias

Apenas uma colônia isolada e pura de cada bactéria selecionada e identificada foi semeada em ágar Müller-Hinton (MH) (Oxoid) e incubada a 37°C entre 18 e 24

horas. Estas colônias foram transferidas para BHI (*Brain Heart Infusion*) (Oxoid), contendo 15% de glicerol e foram estocadas em ultrafreezer a -80°C.

3.4. Sensibilidade aos agentes antimicrobianos

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) foi realizado pelo método de disco de difusão, como descrito e recomendado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) ⁸⁸.

O inóculo bacteriano foi preparado a partir de crescimento bacteriano de 18 horas em solução fisiológica esterilizada equivalente 0,5 da escala de McFarland, correspondente a 1×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC/mL), utilizando nefelometro comercial (Densimat, bioMérieux). Com auxílio de suabe foi feita a inoculação da suspensão bacteriana em placa de petri contendo meio de cultura ágar Muller Hinton (Oxoid) e posteriormente foram colocados os discos de antimicrobianos (Oxoid). A leitura do TSA foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C. Os halos de inibição foram medidos e os resultados foram avaliados de acordo com CLSI 2013 ⁸⁹. Os antimicrobianos avaliados foram: amoxicilina-ácido clavulânico (AMC) (20/10µg), piperacilina-tazobactam (TZP) (100/10µg), cefotaxima (CTX) (30µg), ceftazidima (CAZ) (30µg), ceftiofur (EFT) (30µg), cefepime (FEP) (30µg), ceftiofur (FOX) (30µg), aztreonam (ATZ) (30µg), ertapenem (ETP) (10µg), ácido nalidíxico (NAL) (30µg), ciprofloxacina (CIP) (5µg), levofloxacina (LEV) (5µg), enrofloxacina (ENR) (5µg), cloranfenicol (CHL) (30µg), forfenicol (FFC) (30µg), gentamicina (GEN) (10µg), sulfametoxazol-trimetropina (SXT) (1,25/23,75µg), tetraciclina (TET) (30µg).

Adicionalmente, para a investigação da produção de ESBL, foi utilizado teste de disco aproximação (DDST, do inglês *Double Disk Screening Test*) ⁹⁰. Esta metodologia fundamenta-se na utilização de difusão em disco, utilizando discos de cefalosporinas de amplo espectro (cefotaxima, ceftazidima, cefepime) e aztreonam aproximando-os ao disco de amoxicilina com ácido clavulânico (inibidor de beta-lactamase). Após incubação de 18-24hs a 37 °C, a bactéria foi considerada produtora de ESBL quando observada zona de sinergismo (ou zona fantasma) entre os antibióticos testados/aproximados ao ácido clavulânico.

3.5. Linhagens controle

As bactérias utilizadas como controle neste trabalho estão listadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Linhagens bacterianas utilizadas como controle positivo de genes e plasmídeos de resistência avaliados nos experimentos

Bactérias-controle	Característica
<i>E. coli</i> J53 (TEM-1) ^a	Produtora de TEM-1
<i>E. coli</i> J53 (SHV-1) ^a	Produtora de SHV-1
<i>E. coli</i> RJ-15317 ^b	Produtora de CTX-M-2
<i>E. aerogenes</i> RJ-159835 ^b	Produtora de CTX-M-8
<i>E. coli</i> RJ-24694b ^b	Produtora de CTX-M-9
<i>E. coli</i> CTX-M-25 ^c	Produtora de CTX-M-25
<i>K. pneumoniae</i> KPC ^c	Produtora de KPC
<i>E. coli</i> pyo 2381 SPM-1	Produtora de SPM
<i>S. marcescens</i> BES-1 ^b	Produtora de BES-1
<i>A. baumannii</i> OXA-23 ^c	Produtora de OXA-23
<i>K. pneumoniae</i> OXA-48 ^c	Produtora de OXA-48
<i>A. baumannii</i> OXA-58 ^c	Produtora de OXA-58
<i>P. vulgaris</i> n° 20 ^c	Gene <i>ampC</i> (<i>cmy</i> -2)
<i>C. freundii</i> HCF 09 CMY ^d	Gene <i>ampC</i> (<i>cmy</i>)
<i>A. hydrophila/caviae</i> HCF 58 MOX ^d	Gene <i>ampC</i> (<i>mox</i>)
<i>M. morganni</i> HCF 103 DHA ^d	Gene <i>ampC</i> (<i>dha</i>)
<i>H. alvei</i> HCF 16 ACC ^d	Gene <i>ampC</i> (<i>acc</i>)
<i>E. cloacae</i> HCF 29 ACT ^d	Gene <i>ampC</i> (<i>act</i>)
<i>E. coli</i> pGL3 FOX-1(n° 22) ^c	Gene <i>ampC</i> (<i>fox</i> -1)
<i>A. hydrophila/caviae</i> HCF 58 MOX ^d	Gene <i>ampC</i> (<i>fox</i>)
<i>E. coli</i> DH5α Grupos Inc ^f	Controles replicons

Fonte: Autora

^aLinhagens cedidas pelo Dr. David Livermore, *Antibiotic Resistance Monitoring and Reference Laboratory*, Londres, Inglaterra.

^bLinhagens cedidas pelo Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio, Laboratório Fleury Medicina Diagnóstica, São Paulo, Brasil. BONNET et al. 2000a.

^cLinhagens cedidas pelo Prof. Dr. Laurent Poirel, *Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre*, Paris, França.

^dLinhagem cedida pela Dra. Ana Lucia da Costa Darini, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

^eLinhagens cedidas pela Dr^a Teresa Coque, *Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria*, Madri, Espanha.

^fLinhagens cedidas pela Dr^a Alessandra Carattoli, *Istituto Superiore di Sanità*, Roma, Itália.

3.6. Detecção dos genes produtores de β -lactamases e de determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR) por PCR

A detecção de genes codificadores de β -lactamases e de PMQR foi realizada por PCR e sequenciamento. Foram pesquisados os genes codificadores de: ESBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M-1, 2, 8, 9, 25}, *bla*_{BES}), carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{OXA-23, 48 e 58}), AmpC (*bla*_{CMY}, *bla*_{FOX}, *bla*_{LAT}, *bla*_{ACT}, *bla*_{MIR}, *bla*_{DHA}, *bla*_{MOR}, *bla*_{ACC}).

Entre os PMQR foram pesquisados: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qepA* e *aac(6')-Ib*.

3.6.1. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada como descrito por Bolano e colaboradores (2001), com modificações⁹¹. O protocolo baseia-se na lise mecânica das células, obtida pelo uso de pérolas de vidro tratadas e foi adaptado para bactérias, não sendo necessária a adição de enzimas para a ruptura da parede celular e membrana plasmática.

Cada linhagem bacteriana foi cultivada em 5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Oxoid) a 37°C, por 18 horas. Após a incubação, as células bacterianas foram centrifugadas a 5600 xg por 5 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso com 5 mL de solução fisiológica esterilizada (0,85% de NaCl); a centrifugação foi repetida e o sobrenadante descartado. Ao sedimento bacteriano foi adicionado o mesmo volume de pérolas de vidro (~ 600 μ m de diâmetro), previamente tratadas com ácido nítrico.

Após a adição de pérolas de vidro sobre o sedimento bacteriano, foi adicionado também, um volume de solução de lise (Tris-HCl 0,2M pH 8,5; NaCl 1,5%; EDTA 25mM pH 8; SDS 0,5% em água destilada) correspondente a 3 vezes o volume de sedimento bacteriano (proporção 3:1). A mistura (sedimento bacteriano, pérolas de vidro e solução de lise) foi agitada, vigorosamente, em agitador mecânico (vortex), por 10 minutos em temperatura ambiente.

Um volume de 500 μ L de cada extração foi transferido para um novo microtubo de centrifuga, ao qual foi adicionado o mesmo volume da mistura fenol - clorofórmio-álcool isoamílico (proporção de 25:24:1), para eliminar proteínas contidas na mistura. O material contido em cada microtubo foi homogeneizado, por inversão, e centrifugado a

16.000 xg por 20 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante de cada tubo foi transferido para um novo tubo e acrescentado isopropanol absoluto (Merk) a 4°C, na proporção 1:1, e mantido à temperatura de -20°C, por 18 horas para precipitação do DNA. Após este período, os tubos foram centrifugados a 16.000 xg por 10 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e ao tubo foi acrescentado 1 mL de etanol (Merck) a 4°C. A centrifugação foi repedida e o sobrenadante descartado. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente para a secagem do DNA.

Após a secagem, o DNA foi eluído em 50µL de água ultra-pura (W-PCR, Sigma) e mantido a 4°C por 18 horas. Posteriormente, o DNA foi tratado com 1 µL de solução de RNase (10 µg/mL) e mantido a 37 °C, por 1 hora. O produto da extração foi avaliado em relação à pureza e quantificado utilizando-se o equipamento Nanodrop (Thermo Scientific), em seguida e mantido a -20 °C, até o momento do uso.

3.6.2. Condições de PCR

As PCRs foram realizadas para volume final de 25µL sendo adicionados: 60ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada um dos quatro nucleotídeos (Thermo-Scientific, USA), 2,5 µL de solução tamponante PCR 10X concentrado (Thermo-Scientific, USA), 2,0 mM de solução de MgCl₂ (Thermo-Scientific, USA), 0,625U de Taq DNA polimerase (Thermo-Scientific, USA), 21pmol de cada um dos *primers* (Invitrogen Life Technologies) e água ultra-pura (q.s.p. 25 µL, Sigma).

Para amplificação dos genes em estudo foi usado, inicialmente, uma etapa de desnaturação de 94°C por 5 minutos e, posteriormente 30 ciclos com as seguintes temperaturas de 94°C por 1 minuto (desnaturação), temperatura de anelamento por 1 minuto (Quadros 2 e 3) e 72°C por 1 minuto (extensão). Para finalizar, uma única etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. O termociclador utilizado para os experimentos foi Mastercycler Gradiente (Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

Quadro 2 - *Primers* utilizados na detecção de genes codificadores de β -lactamases

Gene	Primer	Sequências (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do produto (pb)	Referência*
<i>bla</i> _{KPC}	KPC f KPC r	GTATCGCCGTCTAGTTCTGCTG GTTGACGCCCAATCCCTCGA	61	860	Andrade L.N. (2011)
<i>bla</i> _{SPM-1}	SPM-P1 f SPM-P2 r	GAACCTACCTAAATCGAGAGCC CTACAGTCTCATTTTCGCCAACG	60	829	Andrade L.N. (2011)
<i>bla</i> _{OXA-23}	OXA-23f OXA-23 r	AAGCATGATGAGCGCAAAG AAAAGGCCCATTTATCTCAAA	54	1.066	Queenan and Bush (2007)
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48 f OXA-48 r	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	55	744	Queenan and Bush (2007)
<i>bla</i> _{OXA-58}	OXA-58 f OXA-58 r	TTATCAAAAATCCAATCGGC TAACCTCAAACCTTCTAATTC	45	934	Queenan and Bush (2007)
<i>bla</i> _{TEM}	TEM f TEM r	ATGAGTATTCAACATTTCCG CTGACAGTTACCAATGCTTA	58	867	Andrade L.N. (2011)
<i>bla</i> _{SHV}	SHV f SHV r	GGGTTATTCTTATTTGTCTGC TTAGCGTTGCCAGTGCTC	56	930	Andrade L.N. (2011)
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	CTX-M1 f CTX-M1 r	AAAAATCACTGCGCCAGTTC AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT	52	415	Woodford et al (2006)
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	CTX-M2 f CTX-M2 r	ATG ATG ACT CAG AGC ATT CG TGG GTT ACG ATT TTC GCC GC	57	866	Saladin et al (2002)
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	CTX-M9 f CTX-M9 r	ATG GTG ACA AAG AGA GTG CA CCC TTC GGC GAT GAT TCT C	57	870	Saladin et al (2002)
<i>bla</i> _{CTX-M-8,-25}	M8-25 f M8-25 r	CTGGAGAAAAGCAGCGGGGG ACCCACGATGTGGGTAGCCC	51	581	Andrade et al. (2010)
<i>bla</i> _{BES}	BES f BES r	CGGTGGTTGCTGGTGGTGATA CTGTGCCAGTCTTGTCGCCT	61	871	Andrade et al. (2010)
<i>bla</i> _{CMY, MOX e FOX}	AmpC I f AmpC I r	GATGGCAARGCCCACTAYTTC TTGGCCAGCATGACGATG	56	917	D' Andrea et al. (2006)
<i>bla</i> _{CMY/LAT, ACT e MIR}	AmpCII f AmpCII r	CAGGCYATTCCGGGTATGG GCCAGTTVAGCATYTCCCAG	56	763	D' Andrea et al. (2006)
<i>bla</i> _{DHA/MOR}	AmpCIII f AmpCIII r	CATTAAACCGCTGATGGCAC GCTTTGACTCTTTCGGTATTCG	54	1008	D' Andrea et al. (2006)
<i>bla</i> _{ACC}	AmpC IV f AmpC IV r	AAGGTGCTCTGGCTGCTAATATC TTCCAATGAGCTCAGGATTTTATAC	54	1094	D' Andrea et al. (2006)
<i>bla</i> _{CMY-2 like}	CMY f CMY r	GGGCCCCGGACACCYTTTTGC TAAGTGTAGATGACARCAGG	53	1256	D' Andrea et al. (2006)
<i>bla</i> _{FOX}	FOX A FOX B	TGTGGACGGCATTATCCAG AAAGCGCGTAACCGGATTG	54	877	Mataseje et al. (2011)

Fonte: Autora

Quadro 3 - *Primers* utilizados na detecção de genes de resistência às quinolonas

Gene		Primer	Sequências (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do produto (pb)	Referência*
<i>qnrA1</i> <i>qnrA6</i>	a	QnrAm-f QnrAm-r	AGAGGATTTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	54	580	Cattoir V. et al. (2007)
<i>qnrB1</i> <i>qnrB6</i>	a	QnrBm-f QnrBm-r	GGMATHGAAATTCGCCACTG TTGCGYGYCGCCAGTCGAA	54	264	Cattoir V. et al. (2007)
<i>qnrS1</i> a <i>qnrS2</i>		QnrSm-f QnrSm-r	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	54	428	Cattoir V. et al. (2007)
<i>qnrC</i>		QnrC-f QnrC-f	GGGTTGTACATTTATTGAATC GGGTTGTACATTTATTGAATC	50	447	Wang M. et al. (2009)
<i>qepA</i>		QepA-f QepA-r	CGTGTGTGCTGGAGTTCTTC CTGCAGGTACTGCGTCATG	61	403	Minarini L.A.R. et al. (2008)
<i>aac(6')-Ib</i>		AAC6'-A AAC6'-B	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	60	482	Minarini L.A.R. et al. (2008)

Fonte: Autora

3.7. Determinação de ambiente genético dos genes codificadores de ESBL

O ambiente genético das regiões *upstream* e *downstream* dos genes codificadores de ESBL foi caracterizado por PCR como previamente descrito ⁹². Adicionalmente, quando o elemento de inserção *ISCR1* for encontrado na região *upstream* ou *downstream* dos genes codificadores de β -lactamase, duas PCRs adicionais foram realizados usando *Long PCR Enzyme Mix* (Thermo-Scientific, USA) com primers *forward* Sul1-F (5'GCC CTG TCC GAT CAG ATG CA 3') ou Int1-F (5' TCC AGAACC TTG ACC GAA CG 3') combinado com um primer reverso para o gene codificador de β -lactamase para a pesquisa de integron de classe 1 ⁹².

3.8. Eletroforese em campo pulsado

Cada amostra bacteriana foi inoculada em 5 mL de caldo BHI e incubada a 37°C durante 18 horas. Uma alíquota de 1,5 mL da cultura foi transferida para um micrtubo de centrifuga e centrifugada por 2 minutos a 16.000 xg, a 4°C. As células foram lavadas em 500 μ L de solução tamponante PIV (10Mm Tris, 1,0M NaCl), novamente centrifugadas, com posterior descarte do sobrenadante. O sedimento foi suspenso em

200 µL de solução tamponante PIV e 150 µL foram transferidos para um novo tubo e colocados em banho de água a 42°C por 5 minutos para o equilíbrio da temperatura.

Em seguida, 150 µL de agarose (1,5% Agarose Ultra Pure - Invitrogen) foram adicionados rapidamente ao tubo e homogeneizadas. Os blocos de agarose foram feitos e colocados em uma solução de lise EC (6mM Tris, pH 8,0; 1M NaCl; 100mM EDTA, 0,2% deoxycolato de sódio e; 0,5% Na lauryl sacosil; 0,5% Brij 58) acrescentado-se RNase à concentração final de 20 µg/mL e incubados por 4 a 5 horas a 37°C. Após este período, a solução EC foi substituída por solução de lise ES (EDTA, pH 9; sarcosil 1%) acrescido de proteinase K na concentração de 1mg/mL, esta solução foi incubada por 18 horas a 50°C. Os blocos de agarose foram lavados 5 vezes, por um tempo de 30 minutos cada, com 13 mL da solução tamponante TE 1x (10mM Tris, pH 7,5; 1mM EDTA, pH 8,0). Um único bloco foi colocado em 100 µL de solução tamponante da enzima de restrição a ser usada (1x) e deixada à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, a solução foi substituída por solução tamponante fresca e foram adicionadas 30 unidades de enzima de restrição *Xba I* (Fermentas) seguido pela incubação em banho de água por 18 a 20 horas, a 37°C. Foram preparados 150 mL de gel a 1% (Agarose Ultra Pure Invitrogen) em solução tamponante TBE 0,5x (0,89M Tris; 0,89 M ácido bórico; 0,25 M EDTA, pH 8,0).

A eletroforese foi realizada em aparelho *Chef DRIII System* (Life Science Research, Bio Rad), utilizando-se solução tamponante TBE 0,5x e à temperatura de 14°C por 20 horas, com pulsos de 5 a 20 segundos por 20 horas, 180 V, com ângulo de 120°. Após esse procedimento o gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL) por 30 minutos. Em seguida, o gel foi exposto a radiação ultravioleta (UV) a 302 nm para visualização do resultado e fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação AlphaImager (Alpha Innotech).

O gel foi analisado usando o software BioNumerics, versão 5.01 (Applied Maths) e o perfil normalizado foi comparado usando o índice de similaridade de DICE. Foi gerado um dendrograma usando o método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean* (UPGMA).

Os isolados foram considerados do mesmo tipo de PFGE quando a similaridade genética foi maior que 85%.

3.9. Caracterização de Grupos Filogenéticos para isolados de *E.coli*

A determinação dos grupos filogenéticos foi realizada por método previamente descrito ⁹³. Este método classifica cada isolado de *E. coli* em um dos quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 ou D) descritos e é baseado na presença/ausência dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento TSPE4.C2 DNA ⁹³.

3.10. Sequenciamento de produtos de PCR

Os produtos de PCR foram sequenciados no sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies – Applied Biosystems)², de acordo com as recomendações disponíveis no *website*:

<http://www.genoma.ib.usp.br/servicos/sequenciamento-de-dna-sanger>.

Os fragmentos gerados foram purificados com *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, USA) e ambas as fitas foram sequenciadas.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies – Applied Biosystems). Inicialmente, cada produto de PCR a ser sequenciado foi amplificado utilizando condições padrão recomendadas pelo Kit, utilizando 200 ng de produto de PCR, 5µM de *primer forward* e/ou *reverse* (Invitrogen Life Technologies). Em seguida, o sequenciamento foi realizado em tubos capilares de 36cm utilizando o polímero POP7. As sequências de DNA foram analisadas pelo software *Sequencing Analysis 5.3.1* utilizando *Base Caller KB*.

As sequências de DNA obtidas foram, então, analisadas visualmente utilizando o *software ChromasPro* versão 1.33 (Technelysium Pty LTDA).

O sequenciamento foi utilizado na identificação de genes de resistência, determinação do tipo de plasmídeo ColE, MLST e pMLST.

² O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano – USP.
<http://www.genoma.ib.usp.br/>

3.11. Tipagem por *multilocus sequence typing*

Os genes *housekeeping* analisados foram *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*, and *adk*. **Multilocus sequence typing** (MLST) foi realizado usando esquema de Achtman e a sequência de nucleotídeos para gerar o perfil de alelos foi analisada seguindo <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>. As sequências foram importadas para o banco de dados de MLST de *E. coli* usando o website (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) para determinar o ST. Alelos e STs que ainda não tinham sido previamente descritos, foram então, adicionados ao banco de dados recebendo as novas designações pelo curador do banco de dados.

3.12. Pesquisa de plasmídeos

3.12.1. Tipagem dos plasmídeos por grupos de incompatibilidade

Foi realizada a tipagem de *replicons* (*rep*) de grupos de incompatibilidade (PBRT) como descrito na literatura ⁵⁴. Dezoito pares de *primers* foram utilizados em 5 PCR *multiplex* e 3 PCR simples para pesquisar os *replicons* FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-I₇, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F e FII.

3.12.2. *Plasmid multilocus sequence typing*

Na metodologia de *Plasmid multilocus sequence typing* (pMLST), os *primers* e as condições de PCR de plasmídeos IncI seguiram as instruções descritas em <http://pubmlst.org/plasmid/primers/>. As sequências de nucleotídeos foram analisadas usando software ChromasPro version 1.41 (Technelysium, Austrália). Os alelos foram analisados no banco de dados <http://www.pubmlst.org/plasmid/>.

3.12.3. Caracterização de plasmídeos ColE

Os plasmídeos denominados ColE foram caracterizados usando PCR já descrito por outros autores ⁹⁴. As sequências completas destes plasmídeos foram obtidas pelo método de sequenciamento de Sanger (ABI 3730, Applied Biosystems, USA) e a

análise foi realizada usando softwares Chromas Pro (Technelysium, Austrália) e BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.12.4. Avaliação do DNA plasmideal

A análise do DNA plasmideal (pDNA) foi realizada por PFGE após uso da enzima *S1 nuclease* (Fermentas). *S1*-PFGE permite determinar o número e o tamanho dos plasmídeos. A enzima *S1 nuclease* possui ação seletiva da que cliva totalmente o DNA cromossômico e converte o pDNA circular em pDNA linear. A reação foi realizada segundo recomendações do fabricante da enzima⁹⁵.

3.13. Determinação da localização do gene de resistência de interesse

3.13.1. Plasmideal

Para a determinação do plasmídeo de interesse, foi realizada a transferência do pDNA, a partir do gel de *S1*-PFGE, para uma membrana de náilon.

O gel foi foto documentado *AlphaImager* (Alpha Innotec) e posteriormente colocado em uma solução de HCl 0,5M por 15 minutos para fragmentação do DNA. Em seguida, o gel foi mantido em solução de NaOH 0,4 N, para desnaturação do DNA. Uma vez fragmentado e desnaturado, o DNA foi transferido para uma membrana de nylon Hybond N+ (Amersham Bioscience) pelo método *Southern blot*⁹⁶, utilizando NaOH 0,4 N como solução de transferência.

Após a transferência, a membrana foi mantida em solução de SSC 2X (citrato de sódio 30 mM, NaCl 0,3 M) e posteriormente colocada em TrisHCl 0,5 M, pH=7,0 e seca em temperatura ambiente. O DNA foi fixado na membrana por calor a 80°C por duas horas.

Para a determinação dos genes de interesse, foram sintetizadas sondas utilizando o kit *Amersham™ AlkPhos Direct Labelling Reagents* (GE Healthcare), segundo recomendações do fabricante. A síntese da sonda foi realizada utilizando o produto de PCR purificado e quantificado do gene de interesse. Foi adicionada uma solução de marcação de DNA com fosfatase alcalina e incubada a 37°C.

A membrana contendo o pDNA foi submetida à hibridação, realizada à temperatura de 55-60 °C, por 18 horas. A solução de hibridação foi preparada segundo

recomendações do kit *AmershamTM AlkPhos Direct Labelling Reagents* (GE Healthcare). O sinal de hibridação foi gerado mediante adição de dioxetano, *CPD-StarTM Detection Reagent* (GE Healthcare) e a luminescência detectada após exposição da membrana a filmes de autoradiografia *Hyperfilm-ECL* (GE Healthcare). As revelações dos filmes foram realizada com soluções reveladoras e fixadoras (Kodak).

Após a marcação do gene de resistência aos antimicrobianos a membrana foi lavada com SDS 0,5% para retirada da sonda e uma nova hibridação foi realizada utilizando como sonda o produto de PCR dos *replicons* de plasmídeos previamente identificados para cada bactéria.

3.13.2. Cromossômica

Para a determinação do gene de resistência aos antimicrobianos no cromossomo da bactéria, foi realizada a transferência do DNA, a partir do gel de *Ceu I*-PFGE, para uma membrana de náilon. A metodologia de transferência do DNA do gel para membrana e preparação da membrana para hibridação foi realizada como já descrito⁹⁶.

Para a determinação da localização dos genes de interesse, foram sintetizadas sondas utilizando o kit *AmershamTM AlkPhos Direct Labelling Reagents* (GE Healthcare), segundo recomendações do fabricante. A síntese da sonda foi realizada utilizando o produto de PCR purificado e quantificado do gene de interesse e posteriormente em uma segunda hibridação, o gene RNA 16S da bactéria identificada. Foi adicionada uma solução de marcação de DNA com fosfatase alcalina e incubada a 37°C.

3.14. Experimentos de Conjugação

A transferência de plasmídeos que carregam genes codificadores de β -lactamase foi determinada por conjugação utilizando como receptoras, as linhagens *E. coli* J53, fermentadora de lactose, resistente à azida sódica quando a linhagem doadora não era fermentadora de lactose e *E. coli* K12 C600 não fermentadora de lactose, resistente à estreptomicina quando a linhagem doadora era fermentadora de lactose. Transconjugantes de *E. coli* J53 foram selecionados em ágar MacConkey contendo 2 μ g/mL de cefotaxima e 100 μ g/mL de azida sódica e transconjugantes de *E. coli* K12 C600 foram selecionadas em ágar MacConkey contendo 2 μ g/mL de cefotaxima

acrescido de 300 µg/mL de estreptomicina. A presença de genes codificadores de β-lactamase em transconjugantes foi confirmada por PCR.

3.15. Determinação da virulência dos isolados

3.15.1. Pesquisa de genes de virulência

A presença de genes de virulência foi investigada em isolados de *E. coli* previamente reportados como bactérias MDR, selecionados por serem produtores de ESBL ou AmpC^{97; 98; 99; 100}. A pesquisa dos genes de virulência foi realizada por PCR multiplex. O DNA foi preparado como descrito anteriormente⁹¹. Para os isolados de *E. coli* foram pesquisados 28 genes de virulência, usando *primers* específicos como descrito na literatura⁷⁸ e também foram incluídos no estudo os *primers* para os genes de virulência *hlyF*¹⁰¹, *iss*, *iroN*, *ompT*¹⁰². A função de cada proteína codificada mediante o gene de virulência avaliado está descrita no Quadro 4. A presença de ilha de patogenicidade (PAI) também foi avaliada.

Quadro 4 - Função de genes de virulência avaliados no estudo

Genes de virulência	Proteína codificada/ característica
<i>fimH</i> , <i>papAH</i> , <i>papC</i> , <i>papEF</i> , <i>papGI</i> , <i>papGII</i> , <i>papGIII</i> , <i>sfa/focDE</i> , <i>sfaS</i> , <i>focG</i> , <i>afa/draBC</i> , <i>bmaE</i> e <i>gafD</i> , <i>nfaA</i>	Adesina
<i>iutA</i> , <i>fyuA</i> , <i>iroN</i>	Sideróforo
<i>KpsMT</i> (K1), <i>KpsMT</i> II, <i>KpsMT</i> III <i>KpsMT</i> (K5), <i>rfc</i>	Fator de cápsula
<i>ompT</i>	Porina
<i>traT</i> , <i>iss</i>	Aumento da sobrevivência em soro
<i>ibeA</i> , <i>cvaC</i>	Invasina

3.15.2. Seleção de isolados com potencial de virulência de ExPEC

Foram considerado,s com potencial para ExPEC, os isolados que apresentaram 2 ou mais genes de virulência entre os citados (*pap* - adesinas P, *sfa* ou *foc* -adesinas

S/F1C, *afa* ou *dra* -adesinas, *iutA* -receptor aerobactina e *kpsMIII* -síntese de cápsula de grupo II)^{78; 103; 104}.

3.15.3. Cultivo celular

Os ensaios de adesão e invasão foram realizados com isolados de *E. coli* em cultivo de células epiteliais Caco-2³. Estas células aderentes de linhagem contínua foram cultivadas em meio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) acrescido de 4500 mg/L glicose, 200mM L-glutamina e bicarbonato de sódio sem piruvato de sódio (Sigma-Aldrich). Ao meio de cultivo foram acrescido 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) e estreptomicina (10mg/l). Após a quantificação do número de células Caco-2, estas foram depositadas em placas de 24 poços e incubadas a 37°C e a 5% de CO₂ para a formação de monocamada celular.

3.15.4. Avaliação do potencial de adesão a células epiteliais

Foram selecionados 15 isolados de *E. coli* com potencial genotípico de virulência de ExPEC para os testes fenotípicos de adesão e invasão. O critério para a seleção usado foi a presença do maior número de genes de virulência encontrados na pesquisa por PCR e com diferentes ST (definidos pelo MLST), sendo escolhidos isolados caracterizados com maior potencial de virulência.

Os 15 isolados selecionados para realizar os ensaios de invasão e adesão foram *E. coli* MA (04,09,36), LO (105,106,118,122,126a, 127,129,132,164,167,180,188).

Os isolados de *E. coli* foram cultivados por 18h a 37°C em caldo Luria-Bertani (LB), suspensos em uma solução de 1% de manose (v/p) (Sigma-Aldrich) e ajustadas a concentração de 10⁸ células/mL. Após a quantificação, as bactérias foram inoculadas ao cultivo de células utilizando a multiplicidade de infecção de 100:1 (100 UFC bactérias para cada célula Caco-2) e incubadas a 37°C. Após 3h de infecção as células foram lavadas 6 vezes com PBS (pH 7,4) e rompidas com Triton X-100 0,1% (Sigma-Aldrich). A cultura foi diluída decimalmente (1:10, 1:100, 1:1000) e plaqueada em ágar LB, para contagem de UFC bacteriana. A adesão foi expressa pela média do número de bactérias aderidas (em Log₁₀), descontado o valor da média (em Log₁₀) obtido pelo

³ Realizado em *Cornell University College of Veterinary Medicine*

ensaio de invasão para cada respectiva bactéria. Para obter contagem consistente, os experimentos de adesão e invasão para cada isolado foram realizados ao mesmo tempo. O experimentos foram realizados em triplicada e em 3 diferentes momentos^{105; 106; 107}.

3.15.5. Ensaio de microscopia de fluorescência

Foram depositadas células Caco-2 (10^5 células/mL) em câmaras de cultivo celular *Chamber Slide™ System* (Nunc™ Lab-Tek™ II) e incubadas por 18 h, a 5% de CO₂ para aderência das células. Os isolados de *E. coli* foram cultivados por 18 h a 37°C em caldo LB e concentrados a 10^8 células/mL. Após quantificação bacteriana, foram inoculados ao cultivo de células utilizando a multiplicidade de infecção de 100:1 (100 UFC bacteriana para cada célula Caco-2) e incubados. Após 3h de infecção as células foram lavadas com PBS e fixadas em formaldeído. Após 18h as lâminas foram coradas com o fluoróforo iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich) para visualização em microscópio de fluorescência (Leica TCS SP5 II).

3.15.6. Ensaio de invasão a células epiteliais

A avaliação da capacidade de invasão dos isolados caracterizados como potenciais ExPEC em células Caco-2 foi realizada por ensaio de proteção com antibiótico¹⁰⁸ com modificações. Resumidamente, os inóculos de ExPEC foram preparados e aplicados sobre as células Caco-2 conforme descrição para o ensaio de adesão, utilizando meio DMEM sem antibiótico. Após inoculação, as células foram incubadas a 37°C a 5% CO₂ por 90 minutos. As células infectadas foram lavadas com PBS e após esta lavagem foram adicionados 250 µL de meio DMEM contendo 80µg/mL de meropenem e incubadas a 37°C por 45 minutos para eliminar as bactérias extracelulares, que não invadiram as células. Após esta etapa, as células foram lavadas com PBS e rompidas com Triton X-100 (0,1%) (Sigma-Aldrich) para liberação das bactérias intracelulares. A cultura foi diluída decimalmente (1:10, 1:100, 1:1000) e plaqueada em ágar LB para contagem bacteriana. Após a contagem bacteriana, a eficiência da invasão foi expressa pelo cálculo da média de Log₁₀. Como controle positivo da invasão foi utilizada linhagem de *Salmonella* Typhimurium LT2 e como controle negativo *E. coli* DH5α. As células Caco-2 sem inóculo bacteriano foram utilizadas como controle de esterilidade¹⁰⁷.

O experimento foi realizado em triplicata e em 3 momentos diferentes.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Gêneros e espécies isolados

Pelo critério de seleção adotado, foi possível incluir uma enterobactéria resistente à cefalosporina de 3^a geração de cada um dos 200 suabes cloacais dos frangos de corte, sendo no total, 200 bactérias isoladas e identificadas. Destas, 91,6% (184/200) foram identificadas como *E. coli*, 4,9% (10/200) *E. fergusonii*, 2,2% (4/200) *K. oxytoca* e 1,3% (2/200) *K. pneumoniae*. Não houve isolados de *Salmonella* sp.

4.2. Sensibilidade aos agentes antimicrobianos

Na granja 1, 100% dos isolados foram resistentes aos antimicrobianos cefotaxima, amoxicilina/ácido clavulânico e ácido nalidíxico, 98% resistentes à ciprofloxacina, 95% à levofloxacina, 82% à ceftazidima, 77% à cefoxitina, 75% ao aztreonam, 62% à tetraciclina, 45% à gentamicina, 20% ao cefepime, 17% ao cloranfenicol, 13% ao sulfametoxazol-trimetoprim e 5% à piperacilina/tazobactam. Na granja 2, 100% dos isolados foram resistentes à cefotaxima, amoxicilina/ácido clavulânico, 98% resistentes ao ácido nalidíxico, 91% à ciprofloxacina, 88% à levofloxacina, 52% à ceftazidima, 60% à cefoxitina, 44% ao aztreonam, 93% à tetraciclina, 52% à gentamicina, 16% ao cefepime, 23% ao cloranfenicol, 62% ao sulfametoxazol-trimetoprim e 4% à piperacilina/tazobactam. Em ambas as granjas nenhum isolado apresentou resistência ao ertapenem (Figura 1).

Figura 1 - Porcentagem dos isolados resistentes aos antimicrobianos testados

Fonte: Autora

NAL: ácido nalidíxico, AMC: amoxicilina/Ácido clavulânico, CIP: ciprofloxacina, LVX: levofloxacina, CAZ: ceftazidima, FOX: cefoxitina, ATM: aztreonam, TET: tetraciclina, GEN: gentamicina, FEP: cefepime, CHL: cloranfenicol, SXT: trimetoprim / sulfametoxazol, TZP: Piperacilina/Tazobactam, ETP: ertapenem.

4.3. Identificação de genes de resistência

Entre os 200 isolados, 41 apresentaram fenótipo de ESBL pelo teste de DDST (Double-Disk Synergy test), após realização de PCR, foi detectado o gene *bla*_{TEM} em 9,5% (19/200) dos isolados. O gene *bla*_{CTX-M} foi identificado em 20,5% (41/200) dos isolados e o sequenciamento revelou que 25 isolados possuem o gene *bla*_{CTX-M-2}, 15 o gene *bla*_{CTX-M-8} e apenas 1 o gene *bla*_{CTX-M-15}^{97; 98; 99}. Não foram identificados isolados que possuíam os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{KPC}, *bla*_{SPM-1} e *bla*_{OXA}. Foi identificado o gene *bla*_{CMY-2} em 72% (144/200) dos isolados¹⁰⁰.

O gene *qnrB* foi detectado em 21,5% (43/200) dos isolados e o gene *qnrS* em apenas 1% (2/200) dos isolados. O gene *aac(6')-Ib-cr* foi encontrado em apenas 0,5% (1/200) dos isolados. O gene *qnrA* não foi identificado em nenhum isolado¹⁰⁹.

Serão apresentados a seguir os resultados da pesquisa realizada segundo algumas características avaliadas:

i) *E.coli* carregando gene *bla*_{CTX-M-2} cromossômico

- ii) *E. coli* carreando gene *bla*_{CTX-M-8} em plasmídeos IncI/ST específico
- iii) Enterobactérias carreando genes do grupo *bla*_{CTX-M}, incluindo *E. coli* e outros gêneros e espécies
- iv) *E. coli* carreando gene *bla*_{CMY-2}
- v) *E. coli* carreando genes *qnr*
- vi) Virulência de isolados de *E. coli*

4.4. Detecção de *bla*_{CTX-M-2} no cromossomo em diversos isolados de *E. coli*

Os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA} foram pesquisados por PCR e o sequenciamento confirmou a presença do gene *bla*_{CTX-M-2} em 19 isolados, todos com fenótipo de produção de ESBL detectado pelo DDST. O ambiente genético de *bla*_{CTX-M-2} foi identificado seguindo métodos previamente descritos (item 3.7). *ISCR1* foi encontrado *upstream* ao *bla*_{CTX-M-2} e o gene de resistência foi associado à estrutura de integron de classe 1 do tipo *sul-1*. A maioria dos isolados carreando o gene *bla*_{CTX-M-2} mostrou resistência a todos os β-lactâmicos testados, com 100% de sensibilidade ao ertapenem. Todos os isolados mostraram resistência aos antimicrobianos não-β-lactâmicos CIP, LVX, NAL e TET, 73,7% (14/19) foram resistentes ao GEN e SXT e 31,5% (6/19) ao CHL (Figura 2).

Foram identificados 68,5% (13/19) dos isolados pertencentes ao grupo filogenético A, 26,3% (5/19) ao grupo D e 5,2% (1/19) ao grupo B1 (Figura 2).

De acordo com os critérios utilizados, os 19 isolados de *E. coli* produtores de CTX-M-2 pertencem a 6 diferentes tipos de PFGE. Foram encontrados quatro tipos diferentes de PFGE (A, B, C e D) entre os 6 isolados da granja 1. Na granja 2, foram encontrados dois tipos de PFGE (E e F) entre os 13 isolados. A relação entre os tipos de PFGE de ambas as granjas foi de no máximo 75% (Figura 2).

MLST, realizado de acordo com esquema de Achtman (<http://mlst.ucc.ie/dbs/Ecoli>), mostrou três tipos de sequência (ST). ST2309 não foi atribuído a qualquer complexo clonal (CC) na época da caracterização (07/05/2018), além disso, foi apenas descrito em frangos de corte. ST93 pertence ao CC168 e ST155 ao CC155 (Figura 5). ST93 foi predominante entre os isolados e juntamente com ST155 tem sido associado a infecções em humanos e animais em todo o mundo^{110; 111; 112}.

Todos os 19 isolados produtores de CTX-M-2 apresentaram os replicons F, B/O, K, II e FIB.

Figura 2 - Dendrograma de similaridade genética obtido por *Xba*I-PFGE de 19 isolados de *E. coli* produtores de CTX-M-2

Fonte: Ferreira (2014)

NAL: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, LVX: levofloxacina, TET: tetraciclina, GEN: gentamicina, SXT: trimetoprim / sulfametoxazole, CHL: cloranfenicol.

PFGE após digestão com *SI*-nuclease, transferência por *Southern blot* e hibridação com sondas específicas foram realizadas para pesquisar o gene *bla*_{CTX-M-2} em plasmídeos, no entanto não foi encontrado. O método foi repetido após *I-Ceu-I*-PFGE utilizando sondas para o gene rRNA 16S de *E. coli* e para *bla*_{CTX-M-2} para avaliar a localização cromossômica do gene de resistência. Estas sondas hibridaram na mesma posição, confirmando a inserção de *bla*_{CTX-M-2} no cromossomo de todos os 19 isolados produtores de CTX-M-2 (Figura 3). Além disso, para verificar a possibilidade de integração cromossômica dos plasmídeos juntamente com o gene de resistência, foram utilizadas sondas para cada replicon Inc (F, B / O, K, I1 e FIB) na mesma membrana. No entanto, plasmídeos integrados no cromossomo não foram encontrados.

Figura. 3 – Localização do gene *bla*_{CTX-M-2} em diversos isolados de *E. coli*

Fonte: Autora

(a) perfis de PFGE utilizando a enzima *I-Ceu-I*. (b) *Southern blot* e hibridação com sonda *bla*_{CTX-M-2} após *I-Ceu-I*-PFGE. (c) *Southern blot* e hibridação com sonda para o gene 16S rRNA de *E. coli* após *I-Ceu-I*-PFGE.

Todos os isolados foram considerados multirresistentes a antimicrobianos (não sensíveis a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas)¹⁵, o que demonstraram ser importante reservatório de genes de resistência nesses animais de produção. *bla*_{CTX-M-2} é o gene codificador de ESBL mais prevalente em *Enterobacteriaceae* de isolados clínicos no Brasil^{3; 113} e é frequentemente relatado em bactérias isoladas de animais e fontes ambientais¹⁸. Embora genes *bla*_{CTX-M} estão habitualmente abrigados em plasmídeos, a inserção cromossômica desse gene foi encontrada em *E. coli*, outros genes do grupo *bla*_{CTX-M} já haviam sido descritos anteriormente^{114; 115; 116}. A *ISCR1* encontrada nos isolados de *E. coli* produtores de CTX-M-2 tem sido associada com a mobilização de genes codificadores de CTX-M, tanto em patógenos gram-negativos quanto em gram-positivos¹¹⁷.

Estes resultados sugerem que o uso contínuo de concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos, no ambiente avícola, pode promover a recombinação genética em *E. coli*¹¹⁸. Esta hipótese é suportada devido a diferentes tipos de PFGE e grupos filogenéticos detectados, apontando para a disseminação não clonal de *E. coli* produtoras de CTX-M-2 com gene localizado no cromossomo. A estabilidade do *bla*_{CTX-M-2} cromossômico em linhagens bacterianas ainda deve ser elucidada.

Em resumo, este estudo identificou 19 *E. coli* produtoras de CTX-M-2 isoladas de frangos comerciais para consumo humano no Brasil e caracterizou a inserção do *bla*_{CTX-M-2} no cromossomo bacteriano ⁹⁸.

4.5. Plasmídeos conjugativos IncI1/ST113 e IncI1/ST114 carreando *bla*_{CTX-M-8} em isolados de *E. coli*

Foram caracterizados 6 isolados de *E. coli* carreando *bla*_{CTX-M-8} em plasmídeos conjugativos tipados como IncI1. Os isolados mostraram resistência à CIP, LVX, NAL e a todos os β-lactâmicos testados, exceto piperacilina/tazobactam e ertapenem (Tabela 1). Adicionalmente, o teste de DDST sugeriu fenótipo de produção de ESBL. Estes isolados foram considerados multirresistentes.

A resistência às quinolonas mediada por plasmídeos foi relacionada aos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *acc(6')-Ib*, pois nenhum destes genes foi encontrado. Assim, a resistência observada às quinolonas e fluoroquinolonas, nesses isolados pode estar associada à hiperexpressão de sistemas de efluxo ou modificações nos sítios alvo do fármaco ¹¹⁹. Foi identificado o gene *bla*_{CTX-M-8} em todos os isolados produtores de ESBL e a sequência de inserção *IS10* foi encontrada *upstream* ao gene.

Dois isolados de *E. coli* produtores de CTX-M-8 foram classificados no grupo filogenético A, dois no grupo B1 e outros dois no grupo D. Os isolados produtores de CTX-M-8 foram classificados em cinco diferentes tipos de PFGE (Tabela 1) MLST e mostrou quatro tipos de sequências (ST) (Tabela 1). O ST155 pertence ao CC155, que tem sido associado a animais produtores de alimentos, humanos e isolados ambientais, distribuídos em todo o mundo ^{120; 121}. O ST 1011 foi isolado de humanos no Egito e de animais de produção e animais de companhia na Alemanha. O ST2929 foi isolado apenas de patos na China, enquanto o ST2197 foi descrito apenas em humanos na Europa, de acordo com a base de dados pública MLST.

Os isolados produtores de CTX-M-8 apresentaram *replicons* de grupos de incompatibilidade (Inc) F, I1, FIB e A/C. As transferências de *Southern blot* e as hibridações foram realizadas como descrito previamente em géis de *S1*-PFGE utilizando sondas para grupos Inc ⁹⁶. A hibridação da sonda IncI1 ocorreu na mesma posição de *bla*_{CTX-M-8}. O tamanho do plasmídeo IncI1 foi de aproximadamente 60 Kb. A tipagem do plasmídeo por MLST (pMLST) (<http://pubmlst.org/plasmid>) demonstrou os subtipos ST113 (perfil alélico 1/2/5/10/10) e ST114 (perfil alélico 1/2/8/10/3) (Tabela 1). Além

disso, os plasmídeos carreadores de *bla*_{CTX-M-8} foram transferidos por conjugação em receptor *E. coli* J53 e os transconjugantes foram confirmados por PCR ⁹⁶.

O plasmídeo IncI1 carreando o gene *bla*_{CTX-M-8} não foi comumente detectado em espécimes clínicos humanos na Europa, no entanto, no ano de 2010 foi reportado no Reino Unido em carne de frango importado da América do Sul ⁹². Em 2013, foram identificados os subtipos IncI1 ST113 / ST114 em isolados de *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* e *Salmonella* sp produtores de CTX-M-8 isolados de infecções clínicas humanas, doentes colonizados e alimentos na Alemanha ¹²². Este estudo mostrou que diversas *E. coli* produtoras de ESBL isoladas de frangos no Brasil possuíam o gene *bla*_{CTX-M-8} carregado em EGMs idênticos (IS10, IncI1 / ST113 e IncI1 / ST114) aos relatados na Alemanha ¹²², sugerindo conexão epidemiológica. Além disso, *E. coli* encontrada na Alemanha pertencia aos grupos filogenéticos A e B1, como encontrado no Brasil. Os grupos filogenéticos de *E. coli* podem variar entre espécies animais e regiões geográficas. O grupo A geralmente pertence a *E. coli* comensais e o grupo D está associado a *E. coli* patogênicas intestinais, prevalentes em produtos de origem avícola no Brasil ¹²³.

O gene *bla*_{CTX-M-8} foi recentemente reportado no Canadá e na Europa em diferentes bactérias e fontes ^{92; 122; 124}. Estes dados mostram que *bla*_{CTX-M-8} já não está confinado apenas na América do Sul e não pode ser caracterizado como um gene de resistência endêmico. Além disso, os resultados desta investigação, suportam ainda que os plasmídeos IncI1 (ST113 e ST114) podem estar envolvidos na disseminação deste gene de resistência. Considerando os dados limitados de *Enterobacteriaceae* resistentes aos antimicrobianos em animais de produção no Brasil, este estudo demonstrou que importantes genes de resistência e plasmídeos presentes em bactérias humanas patogênicas e comensais também podem ser encontrados na produção animal.

A disseminação de genes de resistência, EGMs e bactérias resistentes, através da cadeia alimentar e do comércio internacional de produtos alimentares têm sido discutida e sugerida ^{18; 36}. Os resultados deste estudo lançam luz sobre este tópico, com relação à origem e disseminação do *bla*_{CTX-M-8}.

Em resumo, este estudo traz novas informações sobre a presença do plasmídeo carreando o gene *bla*_{CTX-M-8} em animais de produção. A presença de genes codificadores de CTX-M e plasmídeos IncI1 na microbiota de animais de produção pode estar envolvida na crescente prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL em humanos, transmitida através da cadeia alimentar ².

Tabela 1 - Características de isolados de *E.coli* produtores de CTX-M-8 (*bla*_{CTX-M-8} IncI1/ST113 e IncI1/ST114)

Isolados de <i>E.coli</i>	PFGE	Grupo filogenético	MLST (ST)	Resistência não-β-lactâmicos ^a	Plasmídeos Replicon Inc (Kb) ^b	pMLST (ST)
18a	A	D	1011	NAL,CIP,LVX	<u>I1 (60)</u> , F	113
48a	A	D	1011	NAL,CIP,LVX	<u>I1 (60)</u> , F	113
25	B	B1	155	NAL,CIP,LVX,TET	<u>I1 (60)</u> , F, FIB	113
82	C	A	2929	NAL,CIP,LVX,TET	<u>I1 (60)</u> , F, FIB	113
94	D	A	2197	NAL,CIP,LVX	<u>I1 (60)</u> , FIB	113
98	E	B1	155	NAL,CIP,LVX,TET	<u>I1 (60)</u> , F, FIB, A/C	114

Fonte: Autora

^a NAL: ácido nalidixico, CIP: ciprofloxacina, LVX: levofloxacina, TET: tetraciclina

^b O tipo de replicon e o tamanho do plasmídeo que carrega o gene *bla*_{CTX-M-8} estão sublinhados

4.6. Avaliação e caracterização de plasmídeos de interesse em população não clonal de isolados de *Enterobacteriaceae* multirresistentes

Além dos 6 isolados de *E. coli* carregando *bla*_{CTX-M-8} em plasmídeos conjugativos tipados como IncI1, foram detectadas e identificadas outras 16 enterobactérias produtoras de CTX-M plasmideal, sendo 13 *E. coli*, 2 *Escherichia fergusonii* e 1 *Klebsiella pneumoniae*. Os isolados produtores de CTX-M mostraram resistência à maioria dos antimicrobianos β-lactâmicos testados, permanecendo sensíveis apenas aos carbapenêmicos (ETP) (Tabela 2). Também foram observados fenótipos de co-resistência a antimicrobianos não β-lactâmicos, incluindo GEN (6/16), SXT (5/16), CHL (3/16), TET (15/16) e quinolonas NAL (15/16), CIP (15/16) e LEV (14/16). Os 16 isolados produtores de CTX-M foram MDR.

Os 16 isolados produtores de CTX-M incluíam 9 isolados de *E. coli* que possuíam *bla*_{CTX-M-8}, 3 *bla*_{CTX-M-2} e 1 *bla*_{CTX-M-15}, 2 isolados de *E. fergusonii* e 1 *K. pneumoniae* possuíam *bla*_{CTX-M-2}. Os isolados de *E. coli* produtores de CTX-M-2 e produtores de CTX-M-15 foram isolados na granja 1, *K. pneumoniae* produtor de CTX-M-2 foi isolado na granja 2, enquanto que os isolados de *E. coli* produtores de CTX-M-8 foram encontrados em ambas as granjas (Tabela 2).

O ambiente genético caracterizado nos isolados produtores de CTX-M mostrou a sequência de inserção *ISCR1* associada a integron de classe 1 com 7Kb *upstream* ao gene de resistência em 6 isolados produtores de CTX-M-2 (3 *E. coli*, 2 *E. fergusonii* e 1

K. pneumoniae). A sequência de inserção IS10 foi encontrada *upstream* ao gene *bla*_{CTX-M-8} em 8 isolados de *E. coli* (Tabela 2).

A diversidade clonal foi demonstrada entre 13 isolados de *E. coli*, classificados em 9 tipos de PFGE. Os 2 isolados de *E. fergusonii* pertenciam ao mesmo tipo de PFGE com 100% de similaridade. Não houve clones comuns compartilhados entre as granjas estudadas.

Os grupos filogenéticos A, B1 e D foram encontrados entre os isolados de *E. coli*. Sete isolados pertenciam ao grupo filogenético A, quatro foram atribuídos ao grupo filogenético D e dois isolados pertenciam ao grupo filogenético B1. O grupo filogenético B2 não foi encontrado (Tabela 2).

Foi identificada grande variedade de *replicons* de plasmídeos dos grupos IncF (14 F, 11 FIB, 1 FIC), IncII (13), IncY (4) e um de cada grupo A/C, K e HI1. Além disso, a transferência por *Southern blot* e a hibridação mostraram que 9 isolados de *E. coli* continham o gene *bla*_{CTX-M-8} nos plasmídeos IncII com aproximadamente 50 kb. *E. coli* MA41 mostrou *bla*_{CTX-M-2} sendo carregado pelo plasmídeo IncK (35 kb). Os isolados de *K. pneumoniae* e *E. fergusonii* continham o gene *bla*_{CTX-M-2} em plasmídeos que não eram tipáveis por PBRT, contudo a hibridação identificou os plasmídeos de resistência com tamanhos que variavam de 250kb e 260kb, respectivamente (Tabela 2). Os genes de resistência e os tipos de *replicons* associados, identificados por hibridação, foram confirmados por PCR utilizando os transconjugantes obtidos. Nos experimentos de conjugação houve a obtenção de transconjugantes entre os isolados de *E. coli* e a receptora *E. coli* K12 C600 e entre os isolados de *E. fergusonii* e a receptora *E. coli* J53. Os *replicons* dos plasmídeos que carregam os genes de resistência estão sublinhados na Tabela 2. Para os isolados de *E. coli* MA86, MA93 e *K. pneumoniae* LO166 não houve seleção de transconjugantes com a receptora *E. coli* C600, contudo a hibridação mostrou que os genes de resistência estavam abrigados em plasmídeos grandes variando de 200kb a 260kb (não tipáveis por PBRT), o que pode dificultar a transferência lateral de genes de resistência.

pMLST para os *replicons* de plasmídeos IncII foi realizado com transconjugantes e identificou ST113 (perfil alélico 1/2/5/10/10). Além disso, três novos STs foram identificados no presente trabalho e depositados na base de dados pMLST como ST130 (perfil alélico 1/2/8/10/19), ST131 (perfil alélico 1/9/23/4/3) e ST132 (perfil alélico 1/2/23/4/3) (Tabela 2).

Os reservatórios animais podem estar envolvidos na disseminação de bactérias resistentes, que podem ocorrer por contato com animais, alimentos contaminados de origem animal, carne crua, água e meio ambiente. Foi demonstrado que plasmídeos carreadores de genes de resistência em *E. coli* comensais foram transferidos com sucesso para bactérias patogênicas, incluindo *Salmonella* ¹⁶. *E. coli*, *E. fergusonii* e *K. pneumoniae* foram isoladas a partir da microbiota intestinal de frangos de corte aparentemente saudáveis. Entre 16 isolados produtores de ESBL, 93,75% (15/16) foram resistentes a NAL, CIP e TET; 87,5% (14/16) à LEV; 37,5% (6/16) à GEN e 31,25% (5/16) à SXT. Conforme observado, alta porcentagem de co-resistência às quinolonas foi detectada nos isolados produtores de ESBL. Juntamente com β -lactâmicos, esta classe de antimicrobianos tem sido primeira escolha para tratamentos de infecções bacterianas. Considerando que todos os 16 isolados produtores de ESBL foram MDR, o uso frequente desses agentes antimicrobianos atua como pressão seletiva sobre essas bactérias contribuindo para aumentar sua prevalência no ambiente ¹⁶ e para a colonização bem sucedida no trato intestinal das aves.

De acordo com *European Food Safety Authority* a prevalência total de isolados de *E. coli* produtores de ESBL em diferentes espécies animais e carne em 2009 variou entre 2% e 9%, dependendo da fonte ¹⁸. No presente estudo, a prevalência de enterobactérias produtoras de ESBL foi de 8%. Atualmente, no Brasil, pintinhos de um dia de idade podem receber cefalosporina de terceira geração (ceftiofur) para prevenir onfalites e infecções gastrointestinais, o que pode contribuir para selecionar microbiota resistente e consequentemente aumentar os reservatórios de enterobactérias MDR no ambiente animal ¹²⁵, como observado no presente estudo. As enterobactérias produtoras de CTX-M são comuns entre as populações humanas, mas número crescente de relatos descreve a presença no ambiente animal e em alimentos de origem animal ¹²⁶. Este estudo mostra que os frangos são reservatório dos genes de resistência *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{CTX-M-15} em enterobactérias isoladas do trato intestinal. Como mostrado na Tabela 2, foi encontrada ampla diversidade genômica entre todos os isolados de ESBL, classificados entre diferentes tipos de PFGE.

Tabela 2 - Características microbiológicas e moleculares de isolados produtores de CTX-M

Isolados					Gene β -lactamase		Plasmídeos		
Espécies	Resistência	Granja	Grupo Filogenético*	PFGE	<i>bla</i>	Ambiente Genético	Replicon	Tamanho (Kb)	pMLST
<i>E.coli</i> MA1	AMC, CTX, CAZ, FEP, ATM, NAL, CIP, TET	1	B1	Y	CTX- M-15	-	I1,FIB,A/C,F, NT	50	NA
<i>E.coli</i> MA41	AMC, CTX, CAZ, FEP, FOX, ATM, NAL, CIP, LEV, TET, CHL, GEN	1	D	M	CTX-M-2	Int class 1+ ISCR1	K,FIB,F	35	NA
<i>E.coli</i> MA86	AMC, CTX, FEP, ATM, NAL, CIP, LEV,TET, GEN	1	A	O	CTX-M-2	Int class 1+ ISCR1	FIB,FIC,F, NT	200	NA
<i>E.coli</i> MA93	AMC, CTX, FEP, ATM, NAL, CIP, LEV, TET, CHL, SXT	1	A	P	CTX-M-2	Int class 1+ ISCR1	I1,HI1,FIB,F,NT	240	NA
<i>E. fergusonii</i> MA40a	AMC,CTX, FEP, ATM, NAL, CIP, LEV, TET, GEN, SXT	1	NR	K	CTX-M-2	Int class 1+ ISCR1	I1,FIB,F,NT	250	NA
<i>E. fergusonii</i> MA100b	AMC,CTX, FEP, ATM, NAL, CIP, TET, GEN, SXT	1	NR	K	CTX-M-2	Int class 1+ ISCR1	I1,FIB,F,NT	250	NA
<i>K.pneumoniae</i> LO166b	AMC,CTX, FEP, ATM, TET, CHL, GEN, SXT	2	NR	T	CTX-M-2	Int class 1+ ISCR1	NT	260	NA
<i>E.coli</i> MA10b	CTX, FEP, ATM, NAL, CIP, LEV	1	B1		CTX-M-8	IS10	I1,FIB,Y,F	50	ST 113
<i>E.coli</i> MA19a	AMC, CTX, CAZ, FEP, NAL, CIP, LEV, TET,	1	A	D	CTX-M-8	IS10	I1,FIB,F	50	ST 132
<i>E.coli</i> MA32	AMC, CTX, FEP, NAL, CIP, LEV, TET	1	A	H	CTX-M-8	-	I1,F	50	ST 132
<i>E.coli</i> MA58	AMC,CTX, NAL, CIP, LEV,GEN,SXT	1	A	L	CTX-M-8	IS10	I1	50	ST 130
<i>E.coli</i> LO116b	AMC,CTX, FEP, NAL, CIP, LEV,TET	2	D	A	CTX-M-8	IS10	I1,FIB,Y,F	50	ST 131
<i>E.coli</i> LO 137b	AMC, CTX, FEP, ATM, NAL, CIP, LEV, TET	2	D	A	CTX-M-8	IS10	I1,FIB,Y,F	50	ST 131
<i>E.coli</i> LO168	AMC,CTX, NAL, CIP, LEV,TET	2	D	A	CTX-M-8	IS10	I1,FIB,Y,F	50	ST 131
<i>E.coli</i> LO 182	AMC,CTX, FEP, ATM, NAL, CIP, LEV, TET	2	A	E	CTX-M-8	IS10	I1,F	50	ND
<i>E.coli</i> LO 194	AMC,CTX, FEP, ATM, NAL, CIP, LEV, TET	2	A	E	CTX-M-8	IS10	I1,F	50	ND

Fonte: Autora

AMC: amoxicilina-ácido clavulânico, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, FOX: cefoxitina, ATM: aztreonam, NAL: ácido nalidixico, CIP ciprofloxacina, LEV: levofloxacina, TET: tetraciclina, CHL: cloranfenicol, SXT: trimetoprim-sulfametoxazol, GEN: gentamicina; Int class 1: Integron de classe 1

NT: plasmídeos carreando gene ESBL não tipável por PBRT; NA: análise de pMLST não existente para replicon carreando gene de resistência; ND: não determinado usando os primers disponíveis no banco de dados pMLST; NR: não realizado. *Grupos filogenéticos foram determinados para isolados de *E. coli*. O tipo de replicon e o tamanho do plasmídeo que carregam genes *bla*_{CTX-M} estão sublinhados. Os replicons que carregam o gene de resistência nos isolados de *E. coli* números MA1, MA86 and MA93, não foram detectados por hibridação. (-): Negativo para ambiente genético pesquisado

CTX-M-2 é o grupo de ESBL dominante entre os isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* na América do Sul ¹¹³. O gene *bla*_{CTX-M-2} foi encontrado em 37,5% de isolados ESBL, de três diferentes espécies de *Enterobacteriaceae*. Todos os isolados de *E. coli*, *E. fergusonii* e *K. pneumoniae* que possuem o gene *bla*_{CTX-M-2}, compartilharam em comum o integron de classe 1 e *ISCR1* associado ao gene de resistência, sugerindo que ambos os EGM podem ter sido disseminados nas granjas, transferindo a resistência para diferentes plasmídeos. Além disso, o mesmo EGM do gene de resistência foi encontrado numa população bacteriana policlonal, *E. coli* de diferentes tipos de PFGE e 2 espécies diferentes. A *ISCR1* foi previamente atribuída à mobilização de genes de resistência (por exemplo, *bla*_{CTX-M-2}) em plasmídeos, aumentando consequentemente a disseminação de mecanismos de resistência antimicrobiana ⁶¹. Semelhante ao presente trabalho, a estrutura genética “integron de classe 1 –*ISCR1*” foi encontrada associada ao *bla*_{CTX-M-2} na Argentina ¹¹⁷. A associação de genes *bla*_{CTX-M} com integron de classe 1 e *ISCR1* pode contribuir para aumentar a mobilidade do gene de resistência e recombinação com outros grupos de plasmídeo Inc em diferentes hospedeiros bacterianos, e também aumentando o risco de inserções no cromossomo bacteriano, como anteriormente mostrado ⁹⁸. Portanto, dada a natureza não clonal dos isolados resistentes disseminados nas granjas estudadas, podem estar envolvidos plasmídeos e outros EGM. Assim, não só a disseminação clonal pela seleção de um único isolado resistente deve ser considerada para a disseminação da resistência antimicrobiana no ambiente animal ²³.

A enzima CTX-M-8 foi descrita pela primeira vez no ano 2000 a partir de isolados clínicos, no Brasil ¹²⁷. No entanto, também tem sido identificada na Europa e EUA desde então, mas a prevalência ainda é baixa em outros territórios ¹²². Este estudo mostra que *bla*_{CTX-M-8} foi encontrado em maior prevalência (9/16) entre os isolados CTX-M de origem animal. Este gene de resistência foi encontrado em 9 isolados de *E. coli* das granjas 1 e 2, no entanto estes foram classificados em 6 diferentes tipos de PFGE (A, D, E, H, L e um não foi determinado). A análise de plasmídeo mostrou que *bla*_{CTX-M-8} estava localizado em plasmídeos IncI1 com tamanhos semelhantes (50kb) e o elemento de inserção *IS10* foi associado com o gene de resistência em todos os isolados exceto em *E. coli* MA32. Apesar das semelhanças, o pMLST revelou seis STs diferentes, incluindo três STs novos (130, 131 e 132) entre estes plasmídeos. Varibilidade de genótipos e fenótipos dos isolados de *E. coli* resistentes encontrados no

presente estudo demonstram a rica diversidade genética envolvida na disseminação de genes de resistência antimicrobiana. Esta diversidade pode ser uma consequência das populações policlonais de *E. coli* presentes na microbiota intestinal.

CTX-M-15 é uma das mais comuns ESBL detectadas em todo o mundo, em infecções clínicas humanas por diferentes patógenos. No Brasil, esta enzima foi descrita pela primeira vez em 2010, encontrada em isolados clínicos de pacientes hospitalizados ¹²⁸. Em 2008, um estudo avaliou a presença de bactérias resistentes na carne crua de frango do Reino Unido e de outros países, incluindo o Brasil, mas *E. coli* que possui *bla*_{CTX-M-15} não foram encontradas. Somente em 2015, *E. coli* produtora de CTX-M-15 foi isolada pela primeira vez no Brasil em carcaças de frango congeladas ¹²⁹. Entretanto, no presente estudo, foi caracterizado o *bla*_{CTX-M-15} em um isolado de *E. coli* de frangos saudáveis no Brasil pela primeira vez, o que pode ser transferido para carcaças e carnes *in natura*. Os resultados desta investigação corroboram com a literatura atual e mostram o risco de disseminação de genes de resistência e bactérias presentes em animais de produção pela cadeia alimentar. De fato, este gene também foi recentemente descrito em animais de produção em outros países ¹³⁰.

Foram encontrados 11 diferentes grupos Inc de plasmídeos entre os isolados, incluindo IncI1 e IncK. A família de plasmídeos IncI1 é frequentemente associada com genes de resistência ⁵⁰. O banco de dados pMLST atualizado tem mais de 594 STs, dentre estes, 239 pertencem ao perfil IncI1. Neste estudo, o gene *bla*_{CTX-M-8} estava presente em plasmídeos IncI1, correspondendo a 4 diferentes STs, dos quais três (ST 130, ST 131 e ST 132) foram identificados pela primeira vez. A família de plasmídeos IncI1 também foi descrita no Reino Unido, carregando *bla*_{CTX-M-8} em isolados de frango cru importado da América do Sul ⁹². Estes plasmídeos (IncI1) foram altamente disseminados durante a última década e estudo prévio sugere que animais de produção possam servir como reservatório ¹³¹, o que foi confirmado pelo presente estudo. Os plasmídeos IncK foram associados à disseminação de CTX-M no Reino Unido, em animais, humanos e meio ambiente ¹³². Nos Estados Unidos, estes plasmídeos foram identificados em *E. coli* multirresistente isoladas de frangos ¹³³.

Poucos relatos mostram *E. fergusonii* e/ou *K. pneumoniae* portando genes de resistência em animais de produção. *E. fergusonii* resistentes e enterotoxigênicas foram isoladas de frangos na Coreia do Sul e na Índia ¹³⁴. No Japão, *K. pneumoniae* produtor de CTX-M-2 foi identificado em frangos de corte ¹³⁵. Embora *E. fergusonii* possa estar presente no trato intestinal como comensal (microbiota), diferentes relatos sugerem um

alto potencial patogênico, descrevendo fatores de virulência, associados à resistência a multidrogas.¹³⁶ No presente trabalho, foi encontrada *E. fergusonii* MDR produtora de CTX-M-2, carregado por um plasmídeo grande (260kb) este resultado contribui para a melhor compreensão da resistência a agentes antimicrobianos nesta espécie, que ainda possui poucos dados na literatura atual¹³⁷. Apesar de não ser tipável por PBRT, este plasmídeo abriga integron de classe 1 e *ISCR1* associado ao gene de resistência, aumentando os riscos de mobilidade e recombinação com outros plasmídeos. Considerando a capacidade de causar doenças tanto em humanos como em animais, *E. fergusonii* pode emergir como uma nova preocupação para a saúde pública

A presença de enterobactérias produtoras de CTX-M em animais de produção e produtos alimentares crus foi sugerida como fonte potencial de disseminação de genes de resistência em todo o mundo⁹². Além disso, foram descritas semelhanças entre *E. coli* produtoras de ESBL isoladas de frangos e humanos, particularmente os EGM que transportam os genes de resistência³⁶. ESBL dos grupos CTX-M-2 e CTX-M-8 foram previamente identificadas em *E. coli* isolada de carne de frango crua importada da América do Sul para o Reino Unido⁹² e mais recentemente, em enterobactérias isoladas de varejo de carne de frango coletada em mercado do Brasil¹³⁸.

Foram encontrados genes codificadores de ESBL em enterobactérias comensais isoladas de frangos vivos do Brasil em diferentes plasmídeos carreadores de genes ESBL (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{CTX-M-15}). A avaliação epidemiológica mostrou plasmídeos carreadores de genes de resistência de diversos tamanhos, variando de 35 a 260kb. Apesar do grande tamanho dos plasmídeos, alguns destes mostraram ser conjugativos e estavam presentes em diferentes populações de *E. coli* e também *E. fergusonii* e *K. pneumoniae*. Além disso, *ISCR1* ou *IS10* foram detectadas em associação com genes de resistência. Os plasmídeos IncI que carregavam *bla*_{CTX-M-8} eram altamente semelhantes e tinham aproximadamente o mesmo tamanho (50kb), no entanto a análise da pMLST revelou 5 diferentes plasmídeos carregando gene de resistência. Essas evidências também suportam o crescente problema em saúde pública considerando a disseminação de genes de resistência pela cadeia alimentar e do ambiente animal.

4.7. Diversidade de plasmídeos carreando *bla*_{CMY-2} em *E. coli* multirresistentes a antimicrobianos

Foram avaliados 144 isolados de *E. coli* resistentes à cefotaxima (CTX) e a cefoxitina (FOX). Adicionalmente, estes isolados resistentes à CTX também mostraram resistência a outros β -lactâmicos testados, incluindo 100% (144/144) de resistência à AMC e 84% (121/144) à CAZ. A resistência ao ATM foi encontrada em 55% (80/144) dos isolados. No entanto, apenas 4% (6/144) desses isolados apresentaram resistência à TZP e 100% foram sensíveis à FEP e ETP. Além disso, 99% (143/144) dos isolados também foram resistentes a antimicrobianos não β -lactâmicos como NAL e CIP, 97% (140/144) à LEV, 75% (108/144) à TET, 50% (73/144) à GEN, 35% (50/144) à SXT e 24% (34/144) ao CHL (Tabela 3).

Assim, todos os 144 isolados foram considerados MDR. Além disso, PCR e o sequenciamento do DNA mostraram que todos estes isolados continham o gene de resistência *bla*_{CMY-2}. *E. coli* carreando os genes *pampC* tem sido usualmente co-resistentes a outros agentes antimicrobianos comumente utilizados¹⁸. A persistência e disseminação de isolados produtores de pAmpC em animais de produção pode ser agravada pelo uso profilático de cefalosporinas. Os fenótipos de co-resistência também estão envolvidos na manutenção de genes de resistência e plasmídeos em *E. coli*¹³⁹. Assim, outros antimicrobianos frequentemente utilizados, tais como as fluoroquinolonas, podem também desempenhar papel importante na seleção de isolados MDR no ambiente animal^{16; 140}.

O grupo filogenético D de *E. coli* foi o mais prevalente, representando 60% (87/144) dos isolados, 30% (43/144) foram atribuídos ao grupo filogenético A, 6% (8/144) dos isolados pertenciam ao grupo filogenético B2 e 4% (6/144) pertenciam ao grupo filogenético B1 (Tabela 3). Resultados semelhantes foram previamente descritos em *E. coli* carreando *bla*_{CMY-2} isolada de carne de frango no Brasil¹²⁹. Os grupos filogenéticos D e B2 são mais comumente associados a *E. coli* extra-intestinal mais virulentas⁹³. Assim, *E. coli* MDR que carrega *bla*_{CMY-2} destes dois grupos filogenéticos pode ter a capacidade de causar infecções extra-intestinais, representando um risco mais elevado.

A disseminação clonal de resistência antimicrobiana tem sido relatada, destacando a capacidade de isolados resistentes prevalecerem em diferentes ambientes, especialmente comunidades ou hospitais¹⁸. Entre 144 isolados de *E. coli* que carregavam

*bla*_{CMY-2}, foram encontrados 75 tipos diferentes de PFGE, classificados em 21 clusters (Tabela 3). Assim, comprovando uma população de *E. coli* não clonal portadora do mesmo gene de resistência e/ou mesmo do mesmo plasmídeo de resistência (Tabela 3). A combinação de ambiente microbiológico rico e a pressão seletiva nos atuais sistemas de produção avícola, causada por medidas como o uso de antimicrobianos na ração animal, pode contribuir para o estabelecimento bem-sucedido de população diversa de bactérias MDR.

Entre 144 isolados resistentes à CTX, todos carregavam *bla*_{CMY-2}, porcentagem elevada deste gene em frangos de corte. Na Europa, *bla*_{CMY-2} é o gene *pampC* mais prevalente ¹⁸. Entretanto, no Brasil, a presença deste gene é raramente relatada em isolados clínicos, portanto, a vigilância contínua é extremamente importante para evitar a disseminação ou manutenção ambiental deste gene de resistência em bactérias do ambiente hospitalar ^{4; 141}. Recentemente, este gene foi relatado na carne de frango no varejo no Brasil ^{129; 141}. No entanto, o presente estudo relata, pela primeira vez, *bla*_{CMY-2} disseminado em isolados de *E. coli* comensais da microbiota de aves vivas saudáveis no Brasil. A alta prevalência dessas bactérias MDR na carne de varejo pode também representar risco de disseminação para humanos.

Os plasmídeos de resistência que carregavam *bla*_{CMY-2} pertenciam a quatro grupos Inc distintos correspondentes a 51 (35%) de IncK, 21 (14,5%) de IncB / O, 8 (5,5%) de IncA/C e um IncI (0,5%). Entretanto, 63 (44,5%) plasmídeos não foram tipáveis pela metodologia de PBRT (Tabela 3).

Tabela 3 - Características de *E. coli* produtores de CMY-2

Replicon (Inc) carreando <i>bla</i> _{cmv-2}	Isolados (n)	Grupo Filogenético (n)				Resistência aos antimicrobianos (n)													Perfil de PFGE
						β-lactâmicos						não β-lactâmicos							
		A	B1	B2	D	CTX	CAZ	AMC	FOX	ATM	TZP	NAL	CIP	LEV	GEN	TET	SXT	CHL	
K	51	20			31	51	39	51	40	26	1	51	51	49	28	33	8	4	A,B,C,F,H,I,K,M,N,O,P
B/O	21		6		15	21	21	21	21	20	2	21	21	21	8	4			F,H,I
A/C	8			8		8	8	8	8	4	2	8	8	8		8	6	8	A,D,E,F,J,S
I	1				1	1	1	1	1						1	1			R
NT	63	24		1	38	63	52	63	60	30	1	63	63	61	35	61	31	22	A,B,F,G,H,I,K,L,N,Q,U,T

Fonte: Autora

CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina/ácido clavulânico, FOX: cefotaxima, ATM: aztreonam, TZP: piperacilina/tazobactam, NAL: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, LEV: levofloxacina, GEN: gentamicina, TET: tetraciclina, SXT: trimetoprim-sulfametoxazol, CHL: cloranfenicol;

NT: plasmídeos não tipáveis por PBRT carreando gene ESBL

Conforme avaliado por *SI*-PFGE, os plasmídeos que carregavam *bla*_{CMY-2} variaram em tamanho de 50Kb a 150Kb. No entanto, o tamanho não impediu que os plasmídeos de resistência fossem conjugativos. Estes foram transferidos com sucesso para *E. coli* K12 C600, conferindo resistência à CTX a esta bactéria. A capacidade conjugativa dos plasmídeos com genes de resistência aumenta o risco de disseminação bem sucedida para outros hospedeiros bacterianos. Assim, *E. coli* comensal que carregam estes EGM pode ser capaz de transferir os plasmídeos que conferem resistência para patógenos na microbiota, tal como *Salmonella* ¹⁴².

A disseminação do gene *pampC* tanto em humanos como em animais foi associada às famílias de plasmídeos IncF, IncI, IncN, IncA/C, IncL/M e IncK ¹⁸. Os plasmídeos que carregam determinantes de resistência a múltiplos fármacos são geralmente grandes (> 50Kb), conjugativos e podem codificar resistência a todos os principais antimicrobianos usados em terapias, incluindo β -lactâmicos, quinolonas, fluoroquinolonas e tetraciclina. Além disso, estes plasmídeos são altamente eficientes na aquisição e transmissão da maioria dos genes de resistência ⁵⁰.

Os grupos Inc de plasmídeos identificados foram previamente associados a *Enterobacteriaceae* produtoras de CMY-2 em todo o mundo ^{143; 144}, mas ainda não descritos em isolados do Brasil. Em 2010, os plasmídeos IncII e IncK que carregavam *bla*_{CMY-2} foram detectados em frango vivo e pacientes hospitalizados na Holanda ¹⁴⁵. Os mesmos *replicons* de plasmídeos foram posteriormente descritos em isolados de carne de frango no mesmo país em 2013, sugerindo a associação entre estes isolados ¹⁴⁴. No Japão, a presença de IncB/O carregando *bla*_{CMY-2} em *E. coli* isolado de animais foi recentemente descrita pela primeira vez ¹⁴³. Plasmídeo IncA/C tem sido associado com a disseminação de *bla*_{CMY-2} em *E. coli* e *Salmonella* spp. em isolados de humanos nos Estados Unidos ²⁰. Além disso, os plasmídeos que abrigam *bla*_{CMY-2}, abrigam frequentemente outros genes de resistência associados a diferentes classes de antimicrobianos ¹⁴³, aumentando a frequência de isolados MDR. Na Austrália, os *replicons* IncII e IncF foram identificados carregando *bla*_{CMY-2} em *E. coli*, no entanto, IncII foi predominante neste país, presente em 96% dos isolados ^{146; 147}. De acordo com os resultados, IncK foi o plasmídeo mais frequente tipável por PBRT, carreador do gene *bla*_{CMY-2} em diferentes tipos de PFGE em isolados de *E. coli*.

Gene *ampC* mediado por plasmídeo em *E. coli* isolado de carne de frango no varejo foi encontrado pela primeira vez em 2015 no Brasil ¹²⁹. Na Europa, na Ásia e nos

Estados Unidos, *E. coli* carreando *bla*_{CMY-2} já foi relatada em animais de produção, no entanto, a prevalência nos Estados Unidos é elevada, tanto em animais de produção como em humanos^{21; 142; 143}. No Brasil, até o momento, não há relatos que caracterizaram os grupos de plasmídeos IncA/C carreadores de *bla*_{CMY-2} em isolados clínicos humanos. Neste estudo, apenas os plasmídeos IncA/C carreadores de *bla*_{CMY-2} foram identificados em isolados de *E. coli* do grupo filogenético B2, geralmente caracterizados como os mais virulentos em comparação a outros grupos. Esses achados trouxeram novos conhecimentos envolvendo a disseminação de *bla*_{CMY-2} em frangos vivos de granjas no Brasil. Embora haja pouca evidência de disseminação através da cadeia alimentar, os trabalhadores agrícolas em instalações de produção animal estão expostos a maiores riscos de contaminação por *E. coli* MDR de origem animal, que é outra via de colonização na comunidade¹⁴⁸.

E. coli são capazes de receber e disseminar resistência aos antimicrobianos, através de determinantes de resistência, associados a EGM que podem ser transferidos horizontalmente. Além disso, estas bactérias têm elevado potencial para abrigar e se tornarem reservatórios de genes de resistência antimicrobiana¹⁴⁸. Em geral, estes resultados mostram uma porcentagem elevada (72%) de *bla*_{CMY-2} disseminada por diferentes tipos de *replicons* plasmideais, numa população comensal de *E. coli*. Esses achados, juntamente com outros estudos recentes em todo o mundo, demonstram a resistência disseminada às cefalosporinas de terceira geração em animais de produção aparentemente saudáveis, o que pode impactar na redução das opções terapêuticas e preocupação com a saúde pública devido à contaminação ambiental por essas bactérias MDR.

4.8. Identificação e caracterização de determinantes da resistência às quinolonas mediados por plasmídeos

Dos 200 isolados de *Enterobacteriaceae* examinados neste estudo, 23% (46/200) carreavam genes PMQR incluindo *qnrB* (43/200), *qnrS* (2/200) e *aac* (6')-*Ib-cr* (1/200). Entre os isolados produtores de Qnr, que carreavam *qnrB*, 33 foram isolados de *E. coli* (*qnrB19*, n = 29; *qnrB5*, n = 4), 7 *E. fergusonii* (*qnrB19*), 2 *K. oxytoca* (*qnrB19*) e 1 *K. pneumoniae* (*qnrB19*). O gene *qnrS1* foi encontrado em dois isolados de *E. coli* e o gene *aac* (6')-*Ib-cr* foi encontrado em um isolado de *E. coli* (Tabela 4). Nenhum isolado apresentou os genes *qnrA*, *qnrC*, *qnrD*, *qepA* e *oqxAB*. O

determinante de PMQR mais prevalente foi *qnrB* (n = 43), encontrado em diferentes espécies de bactérias. Outros grupos de pesquisa também relataram esse gene como o determinante de PMQR mais frequente, seguido por *qnrS*^{44; 149; 150}. O *qnrB19* (n = 39) foi o gene mais detectado neste estudo, seguido de *qnrB5* (n = 4). O gene *qnrB19* já foi relatado em outros países em *E. coli* de frangos, no entanto, na maioria dos casos, em menor porcentagem^{39; 120; 151; 152} do que o descrito no presente estudo. Estes resultados mostram uma alta prevalência de *qnrB19* em frangos criados para consumo de carne. Existem poucos dados sobre os determinantes de PMQR em humanos e em animais no Brasil, portanto, a prevalência desses genes ainda é pouco compreendida. Outro estudo no Brasil, também relatou o gene *qnrB19* carregado por plasmídeos tipo ColE em quatro isolados de ExPEC coletados de frangos¹⁵³.

Todos os 46 isolados carreadores de genes PMQR apresentaram fenótipo MDR. Entre esses isolados, a resistência aos antimicrobianos testados foi: amoxicilina-ácido clavulânico (100%), cefotaxima (100%), ceftazidima (56%), cefepime (15%), cefoxitina (63%), aztreonam (41%), ácido nalidíxico (NAL 100%), ciprofloxacina (CIP 91%), levofloxacina (LEV 82%), enrofloxacina (ENR 100%), tetraciclina (89%), gentamicina (24%), trimetoprim/sulfametoxazol (63%) e cloranfenicol (46%). Nenhum isolado apresentou resistência à piperacilina/tazobactama e ertapenem (Tabelas 4 e 5).

NAL, CIP e LEV são usados principalmente para tratar infecções do trato urinário e infecções respiratórias em humanos. No entanto, ENR é uma fluoroquinolona exclusivamente desenvolvida para uso em medicina veterinária¹⁵⁴ e tem sido amplamente utilizada como medida profilática em granjas de frangos, para reduzir as infecções intestinais por *Salmonella* e outros agentes patogênicos, o que pode ter contribuído para a seleção da resistência à fluoroquinolona entre esses animais. Além disso, o uso de ENR também contribui para a seleção de linhagens resistentes aos antimicrobianos de outras classes em *E. coli* comensal isoladas de frangos¹⁵⁵. O uso de outros antimicrobianos, como os antimicrobianos β-lactâmicos, poderia beneficiar a co-seleção de *E. coli* não sensível a fluoroquinolonas em frangos comerciais¹⁵⁶, quando EGM, carregando múltiplos determinantes antimicrobianos estão envolvidos¹⁶.

Conforme mostrado na Tabela 4, os 36 isolados de *E. coli* carregando genes PMQR exibiram 18 diferentes perfis de PFGE. Os genes de resistência *qnrB* (*qnrB19* e *qnrB5*) estavam presentes em diferentes isolados de *E. coli* classificados em 15

perfis de PFGE (A a O), demonstrando a disseminação do gene de resistência em uma população bacteriana diversa. Entre os diferentes tipos de PFGE, o maior *cluster* "E" incluiu 12 isolados que carregam *qnrB19*. Foram encontrados dois tipos diferentes de PFGE nos dois isolados de *E. coli* que carregam *qnrS1* (Q e R). *E. coli* carreadora de *aac (6') - Ib-cr* pertencia a um tipo de PFGE diferente (P) dos demais. Os resultados na Tabela 5 mostram que todos isolados de *E. fergusonii* que carregam *qnrB19* pertenciam ao mesmo perfil de PFGE (Ef A). Os dois isolados de *K. oxytoca* que carregavam *qnrB19* possuíam diferentes perfis de PFGE (Tabela 5). A avaliação da população de *E. coli* resistente da granja 1 e da granja 2 mostram nove diferentes perfis de PFGE em cada granja sem nenhum tipo comum de PFGE compartilhado entre as granjas. Esses achados sugerem que a disseminação dos genes de resistência é provavelmente associada a EGM (por exemplo, plasmídeos). Os grupos filogenéticos A, B1 e D foram encontrados entre *E. coli* que carregam genes PMQR. A maioria dos isolados foi identificada como grupo filogenético A (50%), outros 42% dos isolados foram classificados no grupo filogenético D e 8% dos isolados foram identificados pertencentes ao grupo filogenético B1 (Tabela 4). Nenhum dos isolados pertenceu ao grupo filogenético B2. Com base na análise filogenética e no PFGE, a estrutura populacional de isolados de *E. coli* foi diversificada, mesmo na mesma granja avícola, caracterizando disseminação não clonal e demonstrando o potencial desses genes e EGMs serem mantidos por diferentes populações de *E. coli*. No entanto, entre os grupos filogenéticos identificados no presente trabalho, o grupo D também está envolvido em infecções extraintestinais, causando preocupações em contextos clínicos. Os grupos filogenéticos A e B1 são considerados menos virulentos, no entanto, também foram descritos em infecções extraintestinais humanas⁷⁶.

Tabela 4 - Características fenotípicas e genotípicas de isolados de *E.coli* carregando determinantes PMQR

Isolados	Granja	Resistência	PMQR	Plasmídeos	Grupo Filogenético	PFGE
157a	2	AMC,CTX,CAZ,FOX,NAL,CIP,LEV,GEN,TET,SXT	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , HI1, I1, F	A	A
167	2	AMC,CTX,FOX,NAL,CIP,LEV,GEN,TET,SXT	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIB, F	A	A
166a	2	AMC,CTX,CAZ,FOX,NAL,CIP,LEV,GEN,TET,SXT	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIB, F	A	B
109	2	AMC,CTX,CAZ,FOX,NAL,CIP,LEV,TET,SXT	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , K	A	C
107	2	AMC,CTX,CAZ,FOX,NAL,CIP,LEV,TET,SXT,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIB, F	D	D
110	2	AMC,CTX,CAZ,FOX,NAL,CIP,LEV,TET,SXT,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , F	D	E
112	2	AMC,CTX,CAZ,FOX,NAL,CIP,LEV,TET,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIB, F	D	E
115	2	AMC,CTX,CAZ,ATM,FOX,NAL,CIP,LEV,TET,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIB, F	D	E
125a	2	AMC,CTX, NAL,CIP,LEV,TET,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIB, F	D	E
127	2	AMC,CTX,CAZ,ATM,FOX,NAL,CIP,LEV,TET,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIB, F	D	E
135	2	AMC,CTX,CAZ,ATM,FOX,NAL,CIP,LEV,TET,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIB, F	D	E
138	2	AMC,CTX,CAZ,ATM,FOX,NAL,CIP,LEV,TET,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIB, F	D	E
141b	2	AMC,CTX,FOX,NAL,CIP,LEV,TET,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIB, F	D	E
148	2	AMC,CTX,CAZ,ATM,FOX,NAL,CIP,LEV,TET,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIB, F	D	E
149	2	AMC,CTX,CAZ,ATM,FOX,NAL,CIP,LEV,TET,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIB, F	D	E
114b	2	AMC,CTX,CAZ,ATM,FOX,NAL,CIP,LEV,TET,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIB, F	D	E
122	2	AMC,CTX,CAZ,ATM,FOX,NAL,CIP,LEV,TET,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> FIB, F	D	E
176	2	AMC,CTX,CAZ,FOX,NAL,CIP,LEV,GEN,TET,SXT	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIA, FIB, F	D	F
39a	1	AMC,CTX,CAZ,FOX,NAL,CIP,LEV	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , K, B/O	A	G
74	1	AMC,CTX,CAZ,ATM,FOX,NAL,CIP,LEV,TET	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , K	A	G
91	1	AMC,CTX,CAZ, FOX,NAL,CIP,LEV	<i>qnrB5</i>	<u>ColE</u> , K	A	G
123b	2	AMC,CTX,NAL,CIP,LEV,GEN,TET	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , K	A	H
136	2	AMC,CTX,FOX,NAL,CIP,LEV,GEN,TET	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , K	A	H
146	2	AMC,CTX,NAL,CIP,LEV,GEN,TET	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , K	A	H
105	2	AMC,CTX,FOX,NAL,CIP,LEV,GEN,TET	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIA	A	H
147	2	AMC,CTX,FOX,NAL,CIP,LEV,GEN,TET	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , K	A	H
86	1	AMC,CTX,ATM,NAL,CIP,LEV,GEN,TET	<i>qnrB5</i>	<u>ColE</u> , FIB, FIC, F	A	N
106	2	AMC,CTX,CAZ,FOX,NAL,CIP,LEV,GEN,TET,SXT	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIA, F	D	I
143	2	AMC,CTX,FOX,NAL,CIP,LEV,SXT	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , K	A	J

Continua

Isolados	Granja	Resistência	PMQR	Plasmídeos	Grupo Filogenético	PFGE
12	1	AMC,CTX,CAZ,ATM,FOX,NAL,CIP,LEV,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIC, K, F	A	K
37	1	AMC,CTX,CAZ,ATM,FOX,NAL,CIP,LEV,TET,	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , K, B/O	A	L
89	1	AMC,CTX,CAZ,ATM,FEP,NAL,CIP,LEV,TET,CHL	<i>qnrB5</i>	<u>ColE</u> , F	B1	M
82	1	AMC, CTX,FEP,NAL,CIP,TET	<i>qnrB5</i>	<u>ColE</u> , I1, FIB, F	A	O
49a	1	AMC,CTX,CAZ,ATM,FEP,NAL,CIP,LEV,TET,SXT,CHL	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	FIB, F,Y	B1	P
01	1	AMC,CTX,CAZ,ATM,FEP,NAL,CIP,TET	<i>qnrS1</i>	<u>ColE</u> , I1, FIB, F, A/C	B1	Q
93	1	AMC,CTX,ATM,FEP,NAL,CIP,LEV,TET,SXT,CHL	<i>qnrS1</i>	<u>ColE</u> , HI1, I1, FIB, F	A	R
						Conclusão

Fonte: Autora

AMC: amoxicilina-ácido clavulanico, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, FOX: cefoxitina, ATM: aztreonam, NAL: ácido nalidixico, CIP ciprofloxacina, LEV: levofloxacina, TET: tetraciclina, CHL: cloramfenicol, SXT: sulfamethoxazol trimethoprim-, GEN: gentamicina. Os plasmídeos que carregam os determinantes PMQR estão sublinhados.

Tabela 5 - Características fenotípicas e genotípicas de isolados de *K. oxytoca*, *K.pneumoniae* e *E.fergusonii* carreando determinantes de PMQR

Isolados	Espécies	Granja	Resistência	PMQR	Plasmídeos	PFGE
121a	<i>K. oxytoca</i>	2	AMC,CTX,CAZ,FOX,NAL,CIP,LEV,TET,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , FIB, F	Ko A
137a	<i>K. oxytoca</i>	2	AMC,CTX,CAZ,ATM,FOX,FEP,NAL,CIP,LEV,TET,SXT,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , I1	Ko B
108a	<i>K.pneumoniae</i>	2	AMC,CTX,NAL,CIP,LEV,TET,SXT,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u>	Kp A
117c	<i>E.fergusonii</i>	2	AMC,CTX,NAL,CIP,LEV,TET,SXT	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , I1, F	Ef A
123a	<i>E.fergusonii</i>	2	AMC,CTX,NAL,CIP,LEV,TET,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , HI1, I1, F	Ef A
151c	<i>E.fergusonii</i>	2	AMC,CTX,NAL,CIP,LEV,TET,SXT,CHL	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , HI1, I1, F	Ef A
156b	<i>E.fergusonii</i>	2	AMC,CTX,NAL,CIP,LEV,TET,SXT	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , HI1, I1, F	Ef A
157b	<i>E.fergusonii</i>	2	AMC,CTX,CAZ,NAL,CIP,LEV,TET	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , HI1, I1, F	Ef A
169b	<i>E.fergusonii</i>	2	AMC,CTX,NAL,CIP,LEV,TET,SXT	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , I1, F	Ef A
171b	<i>E.fergusonii</i>	2	AMC,CTX,NAL,CIP,LEV,TET,SXT	<i>qnrB19</i>	<u>ColE</u> , I1, F	Ef A

Fonte: Autora

AMC: amoxicilina-ácido clavulanico, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, FOX: cefoxitina, ATM: aztreonam, NAL: ácido nalidixico, CIP ciprofloxacina, LEV: levofloxacina, TET: tetraciclina, CHL: cloramfenicol, SXT: sulfamethoxazol trimethoprim-, GEN: gentamicina. Os plasmídeos que carregam os determinantes PMQR estão sublinhados.

Como mostrado na Tabela 4, em todos os isolados de *E. coli*, os genes *qnrB* e *qnrS* estavam abrigados em plasmídeos ColE. Além disso, em 43 isolados de *E. coli* que possuem plasmídeos ColE carreando *qnrB* também estão presentes outros *replicons*, incluindo IncHI1 (n = 1), IncI1 (n = 2), IncFIA (n = 3), IncFIB (n = 17), IncFIC (n = 2), IncF (n = 22), IncK (n = 12) e IncB/O (n = 2). Os isolados de *E. coli* que abrigavam *qnrS1* mostraram a presença de IncHI1 (n = 1), IncI1 (n = 2), IncFIB (n = 2) IncF (n = 2) e IncA/C (n = 1). O isolado de *E. coli* carreando *aac (6')-Ib-cr* apresentou IncFIB, IncF e IncY, no entanto, não foi possível determinar qual plasmídeo carregava esse gene. Conforme mostrado na Tabela 5, *E. fergusonii* que possuía o gene *qnrB* em plasmídeos ColE, também possuía *replicons* IncHI1 (n = 4), IncI1 (n = 7) e IncF (n = 8). Os isolados de *K. oxytoca* que carregavam *qnrB* também mostraram vários *replicons* como IncFIB (n = 2), IncI1 (n = 7) e IncF (n = 8).

A hibridação por *Southern blot* usando o *S1*-PFGE revelou que os genes *qnrB19* e *qnrB5* estavam localizados em plasmídeos de baixo peso molecular, menores que 10Kb. As sequências de plasmídeos de isolados carreadores do gene *qnrB19* foram analisadas usando ferramentas de banco de dados Genbank e foram encontrados 100% de identidade com plasmídeo pPAB19-3 (número de acesso da GenBank JN985534). Os plasmídeos sequenciados foram caracterizados como ColE e o tamanho foi de 2.989 pb. Na análise do esqueleto do plasmídeo ColE foram encontradas regiões para replicação e mobilização de plasmídeos. A região *qnr* foi localizada perto do local de recombinação específico Xer. A *ISEcp1* foi encontrada nestes plasmídeos *upstream* do gene *psp*, um ativador induzível pelo estresse e do gene *qnr*. Além disso, a presença deste EGM em diferentes granjas de frangos isoladas de diferentes espécies bacterianas, incluindo *E. coli* de diferentes tipos de PFGE e grupos filogenéticos, sugerem a evidência de transferência lateral de genes.

Os plasmídeos ColE identificados em todos os isolados compartilhavam a mesma sequência genética que os relatados em *E. coli* isoladas de paciente em hospital, identificado na Argentina, que circula desde 2007 nesse país¹⁵⁷. No entanto, no presente estudo relatamos esse replicon associado a determinantes de PMQR em isolados de frangos comerciais no Brasil, demonstrando possível risco de disseminação destas bactérias entre animais, alimentos e humanos. Além disso, foi proposto que este conjunto de plasmídeo *Rolling–Circle Replication* (RCR) poderia desempenhar papel na evolução dos plasmídeos e apresentar um modelo para o

intercâmbio de DNA, entre DNA plasmideal mediado por eventos de recombinação específicos do local no oriT e um local alvo Xer¹⁵⁷. Os plasmídeos pPAB19-1, pPAB19-2, pPAB19-3 (pPAB19-3 também detectados aqui), e pPAB19-4 compartilham alta porcentagem de identidade entre eles e com outros plasmídeos que carregam *qnrB19*, anteriormente descritos¹⁵⁷.

Em geral, como demonstrado nas Tabelas 4 e 5, foram encontradas diversas *Enterobacteriaceae*, incluindo *E. coli*, *E. fergusonii* e *K. oxytoca*, carregando genes determinantes PMQR abrigados em plasmídeos ColE. Além disso, esses isolados também possuíam outros importantes *replicons*. Enterobactérias resistentes às quinolonas carregando genes PMQR, também apresentaram resistência a outros antimicrobianos importantes como AMC, CTX, CAZ, ATM, GEN, CHL, TET. Estas características estavam presentes em uma população diversa de *E. coli*, como mostra PFGE e filogenia, demonstrando que esta disseminação de resistência tem natureza não clonal. A preocupação com a disseminação de genes PMQR é que esses genes podem facilitar a seleção de isolados com concentração inibitória mínima mais elevada às quinolonas¹⁵⁸. A disseminação silenciosa pode estar ocorrendo em muitas configurações ecológicas e em diferentes países da América do Sul.

4.9. Potencial de virulência de *E. coli* comensais multirresistentes

Dentre os 32 genes de virulência investigados, *fimH* foi detectado em 100%, dos isolados, *iutA* 88,6%, *KpsMT II* 70,4%, *KpsMT (K5)* 59%, *ompT* 52,2%, *traT* 47,7%, *KpsMT (K1)* 38,6%, *hlyF* 34%, *papC*, *papEF*, *papGI* e *papGII* 25%, *fyuA* 18%, *ibeA* 9%, *iroN* e *iss* 6,8%, *sfal/focDE* e *cvaC* 4,5%, *PAI* e *papGIII* 2,3%. Os genes *papAH*, *KpsMT III*, *bmaE*, *hlyA*, *rfc*, *nfaE*, *gafD*, *cdb*, *focG*, *afal/draBC*, *cnfI* e *sfaS* não foram detectados nos isolados. Como mostrado na Tabela 6, 32/44 (72,7%) isolados foram classificados como ExPEC com base nos critérios estabelecidos anteriormente (item 3.15.2.) e 27,3% foram definidos como não-ExPEC.

O gene *iutA* possui maior capacidade de colonizar os humanos e foi encontrado em mais de 80% dos isolados estudados. Este gene também foi o mais identificado em *E. coli* isolado de carcaças comerciais de frango no Brasil¹²³. O gene *KpsMT II* foi encontrado em 70% dos isolados estudados. Este gene tem sido mais frequentemente relatado em isolados ExPEC de humanos do que de aves¹⁵⁹, no entanto, os dados aqui apresentados sugerem que este gene de virulência também pode estar presente em

elevada porcentagem em granjas avícolas. Estudos epidemiológicos sugerem que aves podem atuar como fonte de ExPEC para humanos, nos casos em que a contaminação da carcaça é alta. Semelhanças genéticas entre isolados de aves saudáveis e carnes processadas de aves têm evidenciado a disseminação dessas bactérias através da cadeia alimentar⁸².

Genes envolvidos na sobrevivência das bactérias em soro são essenciais para o desenvolvimento de bacteremia e 47,7% dos isolados de ExPEC continham o gene *traT*. Os resultados obtidos mostraram que os isolados de *E. coli* aparentemente comensais possuíam fatores de virulência associados à colonização e persistência do isolado, aumentando assim o potencial de causar doença. No Brasil, *E. coli* de carcaças de aves isoladas entre 2007-2013 mostraram aumento da resistência a antimicrobianos e virulência (associada à APEC)¹²³.

Os 44 isolados de *E. coli* foram classificados em grupos filogenéticos A (34%), B1 (10%), B2 (20%) e D (36%). Considerando os 32 isolados potencialmente ExPEC, 38% pertenciam ao grupo A, 28% pertenciam aos grupos do grupo B2, 31% foram classificados no grupo D e 3% no grupo B1. Todos os isolados do grupo B2 foram classificados como ExPEC (Tabela 6).

Os quatro grupos filogenéticos foram encontrados e o grupo D foi o mais predominante. Os isolados de ExPEC são frequentemente classificados primeiramente no grupo B2, sendo este o mais virulento e, em seguida, no grupo D, enquanto os isolados comensais intestinais são classificados nos grupos A e B1^{104; 160}. Os resultados revelaram que o grupo filogenético D e o grupo filogenético B2 foram encontrados na maioria dos isolados, porém os isolados foram obtidos de aves aparentemente saudáveis e são considerados comensais. *E.coli* intestinal do grupo filogenético B2 tem presença variável, o que pode estar associado a fatores epidemiológicos, como a área geográfica, população analisada e origem das amostras. Os fatores de virulência associados a ExPEC podem pertencer a qualquer filogruppo. Dados da literatura demonstram que em grande proporção de comunidade saudável, a colonização intestinal por ExPEC entre outras *Enterobacteriaceae* comensais, pode atuar como potencial reservatório para as variantes patogênicas¹⁶¹.

Tabela 6 - Características genotípicas relacionadas com virulência de *E. coli* MDR

Isolados	Genes Virulência	Grupo Filogenético	ExPEC	ST
LO 132 (*)	<i>fimH,papEF,papC,papGI,papGII,iutA,kpsMTK1,kpsMTII,kpsMTK5,traT,ompT, hlyF</i>	D	+	93
LO 166a	<i>fimH,papEF,papC,papGI,papGII,iutA,kpsMTK1,kpsMTII, kpsMTK5,traT,ompT,hlyF</i>	A	+	5687
LO 188 (*)	<i>fimH,papEF,papC,papGI,papGII,iutA,kpsMTK1,kpsMTII,kpsMTK5,traT,ompT,hlyF</i>	A	+	5687
LO 146	<i>fimH,papEF,papC,papGI,papGII,iutA,kpsMTK1,kpsMTII,kpsMTK5,traT,ompT</i>	A	+	93
LO 167 (*)	<i>fimH,papEF,papC,papGI,papGII,iutA,kpsMTII,kpsMTK5,traT,ompT,hlyF</i>	D	+	5687
MA 09b (*)	<i>fimH,papEF,papC,papGI,papGII,papGIII,iutA,kpsMTK1,kpsMTII,traT</i>	A	+	93
LO 105 (*)	<i>fimH,papEF,papC,papGI,papGII,iutA,kpsMTII,kpsMTK5,traT,ompT</i>	A	+	93
LO 129 (*)	<i>fimH,papEF,papC,papGI,papGII,iutA,kpsMTK1,kpsMTII,kpsMTK5,ompT</i>	A	+	93
LO 192	<i>fimH,papEF,papC,papGI,papGII,iutA,kpsMTK1,kpsMTII,kpsMTK5</i>	A	+	93
LO 106 (*)	<i>fimH,ibeA,PAI,fyuA,iutA,kpsMTII,kpsMTK5,traT,hlyF</i>	D	+	68
LO 121b	<i>fimH,fyuA,iutA,kpsMTK1,kpsMTII,kpsMTK5,traT,ompT,hlyF</i>	B2	+	2309
LO 122 (*)	<i>fimH,fyuA,iutA,kpsMTK1,kpsMTII,kpsMTK5,traT,ompT,hlyF,</i>	D	+	2309
LO 127 (*)	<i>fimH,fyuA,iutA,kpsMTK1,kpsMTII,kpsMTK5,traT,ompT,hlyF</i>	D	+	2309
MA 04 (*)	<i>fimH,fyuA,iutA,kpsMTK1,kpsMTII,kpsMTK5,traT,ompT</i>	D	+	2309
LO 115	<i>fimH,fyuA,iutA,kpsMTII,kpsMTK5,traT,ompT,hlyF</i>	D	+	2309
LO 118 (*)	<i>fimH,papEF,papC,papGI,papGII,iutA,kpsMTK1,kpsMTII</i>	A	+	93
LO 164 (*)	<i>fimH,papEF,papC,papGI,papGII,iutA,kpsMTK1,kpsMTII</i>	A	+	93
MA 10b	<i>fimH,sfa/focDE,iutA,cvaC,traT,iss,iroN</i>	B1	+	nd
MA 78	<i>fimH,iutA,cvaC,traT,iss,iroN,hlyF</i>	B1	-	nr
MA 1	<i>fimH,fyuA,sfa/focDE,iss,iroN</i>	B1	-	nr
MA 27	<i>fimH,iutA,kpsMTK1,kpsMTII,kpsMTK5</i>	B2	+	93
MA 36 (*)	<i>fimH,ibeA,iutA,kpsMTII,kpsMTK5</i>	D	+	354
MA 57	<i>fimH,iutA,traT,ompT,hlyF</i>	D	-	nr
MA 64	<i>fimH,iutA,traT,ompT,hlyF</i>	D	-	nr
MA 75a	<i>fimH,iutA,traT,ompT,hlyF</i>	D	-	nr
MA 91	<i>fimH,iutA,kpsMTII,kpsMTK5,ompT</i>	A	+	nd
LO 101	<i>fimH,iutA,kpsMTK1,kpsMTII,kpsMTK5</i>	B2	+	93
LO 126a (*)	<i>fimH,ibeA,iutA,kpsMTII,kpsMTII</i>	D	+	354
LO 128	<i>fimH,iutA,kpsMTK1,kpsMTII,kpsMTK5</i>	B2	+	93

continua

Isolados	Genes Virulência	Grupo Filogenético	ExPEC	ST
LO 131	<i>fimH, iutA, kpsMTK1, kpsMTII, kpsMTK5</i>	B2	+	93
LO 139	<i>fimH, iutA, traT, ompT, hlyF</i>	D	-	nr
LO 175	<i>fimH, ibeA, iutA, kpsMTK1, kpsMTII,</i>	D	+	nd
LO 180 (*)	<i>fimH, iutA, kpsMTII, kpsMTK5, ompT</i>	A	+	93
LO 183	<i>fimH, iutA, kpsMTII, kpsMTK5, ompT</i>	A	+	nd
MA 52	<i>fimH, iutA, kpsMTII, kpsMTK5</i>	B2	+	93
MA 85	<i>fimH, iutA, traT, ompT</i>	D	-	nr
MA 94	<i>fimH, papGIII, fyuA, , ompT</i>	A	-	2197
MA 97	<i>fimH, iutA, traT, ompT</i>	D	-	nr
LO 117a	<i>fimH, iutA, kpsMTII, kpsMTK5</i>	B2	+	93
LO 134	<i>fimH, iutA, kpsMTII, kpsMTK5</i>	B2	+	93
LO 140	<i>fimH, iutA, kpsMTII, kpsMTK5</i>	B2	+s	93
MA 12	<i>fimH, traT, ompT</i>	A	-	nr
MA 49a	<i>fimH, traT, hlyF</i>	B1	-	nr
MA 18a	<i>fimH</i>	D	-	1011
				conclusão

Fonte: Autora

*Isolados incluídos em ensaios de adesão/invasão; nd:não determinado; nr:não realizado; (+) ExPEC; (-) não ExPEC. Os principais genes de virulência que caracterizam ExPEC estão em negrito.

MLST revelou 7 STs diferentes (Tabela 6), dos quais 6 foram previamente reportados no banco de dados. Alelos e ST que não haviam sido previamente descritos receberam novas designações pelos curadores do banco de dados. Um novo ST (ST 5687) foi caracterizado em três isolados de *E. coli*. Entre os 7 STs identificados neste estudo, quatro (ST68, 93, 354,1011) foram previamente relatados em ExPEC em outros países, todos associados à infecção aviária (APEC) e infecção do trato urinário (UPEC).

O ST93 foi identificado pela primeira vez na Europa e desde 1999 tem sido associado à ExPEC. No Brasil, o ST93 foi relatado em 2001 e 2008 associado a infecções humanas na região nordeste do país e os isolados foram caracterizados como ExPEC (<http://mlst.ucc.ie/dbb/Ecoli>). O ST93 também foi encontrado em diversos países, isolados de aves (APEC) e de humanos (ExPEC) causando infecções^{110; 162; 163; 164}. O ST354 foi relatado no Brasil em 2005 e 2009 associado a infecções humanas causadas pela ExPEC em duas regiões diferentes do país (<http://mlst.ucc.ie/dbb/Ecoli>). Na Europa, o ST354 também foi encontrado associado à ExPEC^{165; 166}. O ST68 foi detectado na Ásia em ExPEC isolada de humanos¹⁶⁷, mas esse ST ainda não havia sido relatado no Brasil.

Os isolados MA04 (*fimH*), MA36 (*fimH*), LO106 (*fimH*), LO126a (*fimH*), LO127 (*fimH*) LO132 (*fimH*, *papC*, *papEF*, *pap* GI e GII), LO164 (*fimH*, *papC*, *papEF*, *pap* GI e GII) e LO167 (*fimH*, *papC*, *papEF*, *pap* GI e GII) apresentaram maior capacidade de adesão. Os isolados LO105 e LO118 (*fimH*, *papEF*, *papC*, *papGI* e GII) mostraram a menor capacidade de adesão. Os isolados LO122 (*fimH*), LO129 (*fimH*, *papC*, *papEF*, *papGI* e GII), LO180 (*fimH*) e LO188 (*fimH*, *papC*, *papEF*, *papGI* e GII) apresentaram baixa capacidade de aderência no momento avaliado devido à sua alta capacidade de invasão.

Todos os isolados incluídos nos ensaios de adesão também foram testados quanto à capacidade de invasão em células Caco-2. O potencial de invasão de *E. coli* LO122 foi significativamente maior, demonstrando capacidade semelhante de invasão à linhagem controle positiva *Salmonella* Typhimurium LT2 ($p > 0,05$). *E. coli* LO129, LO167, LO180 e LO188 também apresentaram alta capacidade de invasão ($p > 0,05$). *E. coli* MA04, MA09, LO118 e LO164 mostraram número significativamente menor de bactérias invasoras nas células Caco-2 (Figura 4).

Figura 4 - Análise quantitativa da aderência e invasão de *E. coli* em células Caco-2 infectadas com isolados com potencial para ExPEC

Fonte: Autora

STM LT2: *Salmonella* Typhimurium LT2

A Figura 5 mostra a análise por microscopia confocal de alguns isolados para avaliar o fenótipo obtido no ensaio de adesão e invasão. É possível visualizar a alta invasividade da linhagem controle *Salmonella* Typhimurium LT2 e a capacidade de invasão semelhante foi observada apenas para o isolado LO122. O isolado ExPEC MA04, demonstra alta capacidade de adesão e o isolado LO118 representa o fenótipo de um isolado com baixa aderência e capacidade de invasão.

ExPEC produz ampla variedade de adesinas, o que pode ajudar a colonizar diferentes tecidos do hospedeiro⁷⁹. Capacidade variável de aderência às células Caco-2 foi observada *in vitro* dentre os 15 isolados fenotipicamente avaliados (Figura 4). A avaliação quantitativa das bactérias invasoras foi realizada pelo ensaio de proteção ao

meropenem (ensaio de proteção com gentamicina modificada) e os resultados obtidos neste ensaio foram semelhantes aos observados na avaliação da microscopia confocal, conforme demonstrado na Figura 5.

Figura 5 - Imagens confocal da avaliação *in vitro* de adesão e invasão de isolados de *E. coli* MDR e *Salmonella* Typhimurium LT2 em células Caco-2

Fonte: Autora

(A) *Salmonella* Typhimurium LT2 usada como linhagem controle de invasão. (B) Perfil de fenótipo altamente invasivo de isolado de *E. coli* MDR com potencial para ExPEC (isolado LO122). (C) Fenótipo aderente de isolado de *E. coli* MDR com potencial para ExPEC (isolado MA04). (D) Fenótipo de isolado de *E. coli* MDR com potencial para ExPEC, com baixa capacidade de aderência e invasão (isolado LO118).

Como demonstrado na Figura. 4, cinco isolados de ExPEC (MA36, LO105, LO118, LO126a e LO167) mostraram capacidade equilibrada entre adesão e invasão. No entanto, outros isolados mostraram maior capacidade de aderir ou invadir as células. Os fenótipos mais proeminentes de invasão foram observados nos isolados LO122, LO129, LO180 e LO188, nos quais foram encontrados em grande número intracelularmente. Notavelmente, o LO122 apresentou capacidade de invasão semelhante à linhagem de controle invasivo *Salmonella* Typhimurium LT2. Os

isolados LO106, LO127 e LO132 demonstram maior aderência do que invasão. A microscopia confocal confirmou o fenótipo desses isolados e, como mostrado na Figura 5, o isolado LO122 foi altamente invasivo e foi encontrado em grande número no citoplasma das células Caco-2 após 3 horas de infecção.

As adesinas, como codificadas pelo gene *fimH* presente em todos os isolados, foram propostas como o primeiro passo necessário para a colonização, além disso, tem a capacidade de atuar em diferentes etapas do processo de infecção¹⁶⁸. Fímbrias tipo 1 são produzidas por isolados de *E. coli*, sendo um importante determinante de virulência envolvido na adesão em células⁷⁹. O grupo do gene *pap* possui 11 genes, as proteínas que codificam *papF* e *papG* são essenciais para a adesão e o produto do *papC* é necessário para a biogênese¹⁶⁹. Os isolados dos animais avaliados, carregaram genes *pap* (25%) e *fimH* (100%).

No Brasil, cerca de 58% de ExPEC resistentes a antimicrobianos isolados de humanos foram relatados como aderentes às células Caco-2¹⁷⁰. Dentre as 15 *E. coli* MDR analisadas fenotipicamente *in vitro*, 100% mostraram capacidade de adesão em células Caco-2. No entanto, isolados com maior capacidade de invasão, como o LO122, demonstraram menor número de bactérias aderentes. O mecanismo de adesão é necessário para a infecção intracelular, embora esses isolados altamente invasivos possam aderir por um curto período de tempo antes da invasão.

Cerca de 72% dos isolados apresentaram genes de virulência que aumentam a capacidade destas bactérias se tornarem ExPEC. O uso de antimicrobianos não leva à seleção de isolados virulentos, mas à disseminação e manutenção de genes de resistência entre isolados comensais⁸¹. O aumento de MDR na microbiota comensal de aves pode ter contribuído para o surgimento de ExPEC MDR em infecções em humanos⁷⁶. Aumento de isolados ExPEC produtores de ESBL e AmpC foi relatado em infecções humanas em hospitais canadenses¹⁷¹.

A associação de multirresistência a bactérias patogênicas, como ExPEC e *Salmonella*, aumenta o impacto que essas bactérias podem causar à saúde animal e humana. A maioria dos isolados avaliados apresentou a presença de genes característicos de ExPEC, porém essas bactérias foram isoladas de aves aparentemente saudáveis, destinadas ao abate e ao consumo. Estudos sobre o risco zoonótico de ExPEC têm relatado a preocupação com a saúde pública nos casos em que ocorre transmissão por meio da cadeia alimentar^{80; 172}. ExPEC estão presentes na microbiota intestinal de parte da população saudável e colonizam assintomaticamente o intestino.

No entanto, essas bactérias são capazes de sobreviver em ambientes extras intestinais e causar doenças em humanos e animais ¹⁶⁰.

Infecções transmitidas por alimentos com ExPEC, resistentes a importantes antimicrobianos, têm sido preocupação para a saúde pública. Neste estudo, isolados de *E. coli* da microbiota de aves portadoras de muitos genes de virulência, caracterizaram esta bactéria comensal como possível ExPEC, com capacidade de adesão e invasão. Esses fatores associados à multirresistência a antimicrobianos mostraram a necessidade de reduzir o uso de antimicrobianos na indústria avícola e frequentemente de realizar o monitoramento de *E. coli* na microbiota de animais produtores de alimentos.

5. Conclusões

- *Enterobacteriaceae* resistentes à cefotaxima (CTX) e/ou ceftazidima (CAZ) isoladas da cloaca de frangos comerciais saudáveis foram encontradas, indicando estes animais de produção como possível reservatório de bactérias resistentes a antimicrobianos.
- Todos os frangos apresentaram enterobactérias MDR.
- Houve presença de grande diversidade de genes codificadores de β -lactamases.
- Foi constatada grande diversidade genética entre os isolados de *E. coli* que possuíam o gene *bla*_{CTX-M-2} localizado no cromossomo. Foi o primeiro relato da inserção no cromossomo deste gene em *E. coli*.
- Entre os isolados de *E. coli* carregando *bla*_{CTX-M-8}, foram identificados plasmídeos idênticos a outros já relatados na Europa, sugerindo possível conexão epidemiológica de disseminação via cadeia alimentar.
- Estão presentes diversos plasmídeos como carreadores de genes ESBL. Plasmídeos diferentes carregavam o mesmo gene de resistência. A avaliação epidemiológica mostrou que os plasmídeos carreadores de genes de resistência possuíam diversos tamanhos, sendo alguns conjugativos, presentes em diferentes populações bacterianas.
- O gene *bla*_{CMY-2} está disseminado por diferentes tipos de *replicons* plasmídeos, na população comensal de *E. coli*.
- Houve alta prevalência de *Enterobacteriaceae* carreadoras de genes determinantes de PMQR
- A disseminação de resistência entre isolados de *Enterobacteriaceae* ocorreu de forma não clonal, sugerindo que plasmídeos conjugativos sejam os principais fatores envolvidos na disseminação de genes de resistência.

- As bactérias comensais da microbiota dos frangos de corte considerados saudáveis, demonstraram potencial de ExPEC incluindo a capacidade de adesão e invasão em células epiteliais *in vitro*.

6. Referências

- 1 JONES, F. T.; RICKE, S. C. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 613-7, 2003.
- 2 WOERTHER, P. L. *et al.* Trends in human fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 744-58, 2013.
- 3 SAMPAIO, J. L.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on beta-lactams and polymyxins. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 47 Suppl 1, p. 31-37, 2016.
- 4 ROCHA, D. A. *et al.* Frequency of Plasmid-Mediated AmpC beta-Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Urine Samples in Sao Paulo, Brazil. **Microbial Drug Resistance**, 15 2015.
- 5 BARTON, M. D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, n. 2, p. 279-99, 2000.
- 6 BYWATER, R. J. Identification and surveillance of antimicrobial resistance dissemination in animal production. **Poultry Science**, v. 84, n. 4, p. 644-8, 2005.
- 7 ALBUQUERQUE, R. Antimicrobianos como Promotores do Crescimento. São Paulo: **Roca**, 2005.
- 8 US Food and drug Administration. Cephalosporin order of prohibition goes into effect. 2012.
- 9 PALERMO-NETO, J. Resíduos de Medicamentos Veterinários em Carne e Ovos. São Paulo: **Roca**, 2005.
- 10 BRASIL. Regulamento Técnico Para Licenciamento e Renovação de Licença de Antimicrobianos de Uso Veterinário. **Portaria Ministerial n.º 193 de 12 de maio de 1998**. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Brasil 1998.
- 11 BRASIL. Proibição da fabricação, importação, comercialização e o emprego de preparação farmacêutica de uso veterinário, nas rações e aditivos alimentares, contendo cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona, em animais cujos produtos sejam destinados ao consumo humano, 1998. **Portaria Ministerial n.º 193 de 12 de maio de 1998**. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Brasil 1998.
- 12 BRASIL. Código de Práticas para Minimizar e Conter a Resistência Antimicrobiana (CAC/RCP 61-2005). **RDC n.º 12/2001 e RDC n.º 13/2001**.
- 13 BRASIL. Institui o Comitê Técnico Assessor para Uso Racional de Antimicrobiano e Resistência Microbiana – Curarem. **Portaria Ministerial n.º 1133 de 6 de julho de 2005**. Brasil 2005.

- ¹⁴ SCHWARZ, S. *et al.* Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 601-4, 2010.
- ¹⁵ 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 Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-81, 2012.
- ¹⁶ CANTON, R.; RUIZ-GARBAJOSA, P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. **Current Opinion Pharmacology**, v. 11, n. 5, p. 477-85, 2011.
- ¹⁷ 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. 736-55, 2011.
- ¹⁸ LIEBANA, E. *et al.* Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. **Clinical Infection Disiases**, v. 56, n. 7, p. 1030-7, 2013.
- ¹⁹ LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 413-20, 2006.
- ²⁰ CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227-38, 2009.
- ²¹ CARATTOLI, A.. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. **Clinical Microbiology Infection**, v. 14 Suppl 1, p. 117-23, 2008.
- ²² LI, X. Z. *et al.* beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 3-4, p. 197-214, 2007.
- ²³ CANTON, R.; COQUE, T. M. The CTX-M beta-lactamase pandemic. **Current Opinion Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 466-75, 2006.
- ²⁴ ROSSOLINI, G. M.; D'ANDREA, M. M.; MUGNAIOLI, C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. **Clinical Microbiology Infection**, v. 14 Suppl 1, p. 33-41, 2008.
- ²⁵ PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-86, 2005.
- ²⁶ LIVERMORE, D. M. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. **Clinical Microbiology Infection**, v. 14 Suppl 1, p. 3-10, 2008.

- 27 SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.
- 28 JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161-82, 2009.
- 29 BAUERNFEIND, A.; CHONG, Y.; SCHWEIGHART, S. Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. **Infection**, v. 17, n. 5, p. 316-21, 1989.
- 30 PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 6, p. 371-9, 2010.
- 31 PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G. A. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 1-11, 2002.
- 32 BAUERNFEIND, A.; GRIMM, H.; SCHWEIGHART, S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, v. 18, n. 5, p. 294-8, 1990.
- 33 BAUERNFEIND, A. *et al.* A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. **Infection**, v. 20, n. 3, p. 158-63, 1992.
- 34 GALETTI, R.; ANDRADE, L. N.; DA COSTA DARINI, A. L. *Pseudomonas aeruginosa* carrying blaCTX-M-2 in Brazil: The occurrence of 'high-risk clones'? **Journal Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 2, p. 153-154, 2015.
- 35 BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004.
- 36 KLUYTMANS, J. A. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 4, p. 478-87, 2013.
- 37 ROGERS, B. A.; SIDJABAT, H. E.; PATERSON, D. L. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 1, p. 1-14, 2011.
- 38 MOROSINI, M. I. *et al.* Antibiotic coresistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and in vitro activity of tigecycline. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 8, p. 2695-9, 2006.
- 39 LITERAK, I. *et al.* Broilers as a source of quinolone-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in the Czech Republic. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 1, p. 57-63, 2013.

- 40 RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1109-17, 2003.
- 41 MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCUAL, A.; JACOBY, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **Lancet**, v. 351, n. 9105, p. 797-9, 14 1998.
- 42 VAN HOEK, A. H. *et al.* Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers Microbiology**, v. 2, p. 203, 2011.
- 43 TRAN, J. H.; JACOBY, G. A. Mechanisms of plasmid-mediated quinolone resistance. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 99, p. 5639-5642, 2002.
- 44 RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M. *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother*, v. 17, n. 2, p. 149-82, 2011.
- 45 POIREL, L.; CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. **Frontiers Microbiology**, v. 3, p. 24, 2012.
- 46 PALLECCHI, L. *et al.* Small qnrB-harboursing ColE-like plasmids widespread in commensal enterobacteria from a remote Amazonas population not exposed to antibiotics. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. 1176-8, 2011.
- 47 KARCZMARCZYK, M. *et al.* Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* food and animal isolates from Colombia: identification of a qnrB19-mediated quinolone resistance marker in two novel serovars. **FEMS Microbiology Letters**, v. 313, n. 1, p. 10-9, 2010.
- 48 DIONISI, A. M. *et al.* Characterization of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrB19* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 4019-21, 2009.
- 49 ROBICSEK, A. *et al.* Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. **Nature Medicine**, v. 12, n. 1, p. 83-8, 2006.
- 50 CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 298-304, 2013.
- 51 DATTA, N.; HEDGES, R. W. Compatibility groups among fi - R factors. **Nature**, v. 234, n. 5326, p. 222-3, 26 1971.
- 52 COUTURIER, M. *et al.* Identification and classification of bacterial plasmids. **Microbiology Reviews**, v. 52, n. 3, p. 375-95, 1988.

- 53 GOTZ, A. *et al.* Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. **Applied Environment Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2621-8, 1996.
- 54 CARATTOLI, A. *et al.* Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal Microbiology Methods**, v. 63, n. 3, p. 219-28, 2005.
- 55 HALL, R. M.; COLLIS, C. M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. **Molecular Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 593-600, 1995.
- 56 STOKES, H. W.; HALL, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. **Molecular Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1669-83, 1989.
- 57 MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nature Reviews Microbiol**, v. 4, n. 8, p. 608-20, 2006.
- 58 ZHAO, W. H.; HU, Z. Q. IMP-type metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 214-26, 2011.
- 59 MAHILLON, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 725-74, 1998.
- 60 POIREL, L.; BONNIN, R. A.; NORDMANN, P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative rods. **Infections Genetic Evolution**, v. 12, n. 5, p. 883-93, 2012.
- 61 TOLEMAN, M. A.; BENNETT, P. M.; WALSH, T. R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 296-316, 2006.
- 62 RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M. *et al.* Common region CR1 for expression of antibiotic resistance genes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** v. 50, n. 7, p. 2544-6, 2006.
- 63 HILTY, M. *et al.* Transmission dynamics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the tertiary care hospital and the household setting. **Clinical Infections Diseases**, v. 55, n. 7, p. 967-75, 2012.
- 64 VALVERDE, A. *et al.* High rate of intestinal colonization with extended-spectrum-beta-lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients. **Journal Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2796-9, 2008.
- 65 DECRE, D. *et al.* Clinical and bacteriologic epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a medical intensive care unit. **Clinical Infections Diseases**, v. 27, n. 4, p. 834-44, 1998.

- 66 AUTHORITY, E. F. S. The public health risks of bacterial strains producing ESBLs and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. **EFSA Journal** 2011, v. 9, p. 2322, 2011.
- 67 BERGENHOLTZ, R. D. *et al.* Characterization of genetic determinants of extended-spectrum cephalosporinases (ESCs) in *Escherichia coli* isolates from Danish and imported poultry meat. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. 207-9, 2009.
- 68 AUTHORITY, E. F. S. The public health risks of bacterial strains producing ESBLs and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. **EFSA Journal**, v. 9, p. 2322, 2011.
- 69 SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens Disease**, v. 4, n. 2, p. 134-63, 2007.
- 70 KAPER, J. B. Pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal Medical Microbiology**, v. 295, n. 6-7, p. 355-6, 2005.
- 71 RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Extraintestinal isolates of *Escherichia coli*: identification and prospects for vaccine development. **Expert Reviews Vaccines**, v. 5, n. 1, p. 45-54, 2006.
- 72 BONACORSI, S. *et al.* *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in uncircumcised infants resemble urosepsis-like adult strains. **Journal Urology**, v. 173, n. 1, p. 195-7; discussion 197, 2005.
- 73 RON, E. Z. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. **Current Opinion Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 28-32, 2006.
- 74 GEORGE, D. B.; MANGES, A. R. A systematic review of outbreak and non-outbreak studies of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* causing community-acquired infections. **Epidemiology Infectious**, v. 138, n. 12, p. 1679-90, 2010.
- 75 DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v. 30, n. 2-3, p. 299-316, 1999.
- 76 PITOUT, J. D. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. **Frontiers Microbiology**, v. 3, p. 9, 2012.
- 77 ASLAM, M. *et al.* Characterization of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* isolated from retail poultry meats from Alberta, Canada. **International Journal Food Microbiology**, v. 177, p. 49-56, 02 2014.
- 78 JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **Journal Infectious Disease**, v. 181, n. 1, p. 261-72, 2000.

- 79 ANTAO, E. M.; WIELER, L. H.; EWERS, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Pathogens**, v. 1, n. 1, p. 22, 2009.
- 80 BERGERON, C. R. *et al.* Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 415-21, 2012.
- 81 JOHNSON, T. J. *et al.* Sequence analysis and characterization of a transferable hybrid plasmid encoding multidrug resistance and enabling zoonotic potential for extraintestinal *Escherichia coli*. **Infectious Immunity**, v. 78, n. 5, p. 1931-42, 2010.
- 82 MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 5, p. 712-9, 2012.
- 83 GUENTHER, S. *et al.* Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* from common European wild bird species. **Veterinary Microbiology**, v. 144, n. 1-2, p. 219-25, 29 2010.
- 84 JOHNSON, J. R. *et al.* Virulence characteristics and phylogenetic background of multidrug-resistant and antimicrobial-susceptible clinical isolates of *Escherichia coli* from across the United States, 2000-2001. **Journal Infectious Disease**, v. 190, n. 10, p. 1739-44, 15 2004.
- 85 GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 321-32, 2004.
- 86 GASTMEIER, P. *et al.* Excess mortality and prolongation of stay due to bloodstream infections caused by multiresistant pathogens in Germany. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 137, n. 34-35, p. 1689-92, 2012.
- 87 NATARO, L. P. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: (Ed.). Manual of Clinical Microbiology. 10th. Washington: **American Society for Microbiology**, 2011. cap. 35, p.603-626.
- 88 CLSI Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. M02-A12. Wayne, PA 2012.
- 89 CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)** 2013.
- 90 JARLIER, V. *et al.* Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Reviews Infectious Disease**, v. 10, n. 4, p. 867-78, 1988.

- ⁹¹ BOLANO, A. *et al.* Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. **Fems Yeast Research**, v. 1, n. 3, p. 221-4, 2001.
- ⁹² DHANJI, H. *et al.* Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. 2534-7, 2010.
- ⁹³ CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied Environment Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555-8, 2000.
- ⁹⁴ GARCIA-FERNANDEZ, A. *et al.* Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 274-81, 2009.
- ⁹⁵ BARTON, B. M.; HARDING, G. P.; ZUCCARELLI, A. J. A general method for detecting and sizing large plasmids. **Anal Biochemistry**, v. 226, n. 2, p. 235-40, 1995.
- ⁹⁶ SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989.
- ⁹⁷ FERREIRA, J. C. *et al.* IncII/ST113 and IncII/ST114 conjugative plasmids carrying *bla*_{CTX-M-8} in *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 80, n. 4, p. 304-6, 2014.
- ⁹⁸ FERREIRA, J. C. *et al.* Detection of chromosomal *bla*_{CTX-M-2} in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens. **Clinical Microbiology Infectious**, v. 20, n. 10, p. O623-6, 2014.
- ⁹⁹ 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 Infectious Disease**, v. 85, n. 4, p. 444-8, 2016.
- ¹⁰⁰ FERREIRA, J. C. *et al.* Diversity of plasmids harboring *bla*_{CMY-2} in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 88, n. 4, p. 361-364, 2017.
- ¹⁰¹ JOHNSON, T. J. *et al.* DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. **Journal Bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 745-58, 2006.
- ¹⁰² RODRIGUEZ-SIEK, K. E. *et al.* Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**, v. 36, n. 2, p. 241-56, 2005.
- ¹⁰³ JOHNSON, T. J. *et al.* Examination of the source and extended virulence genotypes of *Escherichia coli* contaminating retail poultry meat. **Foodborne Pathogens Disease**, v. 6, n. 6, p. 657-67, 2009.

- 104 JOHNSON, T. J. *et al.* Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal Clinical Microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3987-96, 2008.
- 105 DARFEUILLE-MICHAUD, A. *et al.* High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 127, n. 2, p. 412-21, 2004.
- 106 FROMMEL, U. *et al.* Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origins. **Applied Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 5814-29, 2013.
- 107 CIEZA, R. J. *et al.* The IbeA invasin of adherent-invasive *Escherichia coli* mediates interaction with intestinal epithelia and macrophages. **Infectious Immunity**, v. 83, n. 5, p. 1904-18, 2015.
- 108 STEELE-MORTIMER, O. Infection of epithelial cells with *Salmonella enterica*. **Methods Molecular Biology**, v. 431, p. 201-11, 2008.
- 109 FERREIRA, J. C. *et al.* Identification and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* isolated from healthy poultry in Brazil. **Infectious Genetic Evolutions**, v. 60, p. 66-70, 2018.
- 110 DIERIKX, C. *et al.* Extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 60-7, 2013.
- 111 CHEN, Y. *et al.* Serotypes, genotypes and antimicrobial resistance patterns of human diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates circulating in southeastern China. **Clinical Microbiology Infectious**, 19 2013.
- 112 BEN SALLEM, R. *et al.* Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease**, v. 31, n. 7, p. 1511-6, 2012.
- 113 MINARINI, L. A. *et al.* Predominance of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 65, n. 2, p. 202-6, 2009.
- 114 COELHO, A. *et al.* Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 1, p. 73-8, 2010.
- 115 HARADA, S. *et al.* Chromosomal integration and location on IncT plasmids of the *bla*_{CTX-M-2} gene in *Proteus mirabilis* clinical isolates. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1093-6, 2012.

- 116 HIRAI, I. *et al.* Detection of chromosomal *bla*_{CTX-M-15} in *Escherichia coli* O25b-B2-ST131 isolates from the Kinki region of Japan. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 6, p. 500-6, 2013.
- 117 ARDUINO, S. M. *et al.* Molecular epidemiology of orf513-bearing class 1 integrons in multiresistant clinical isolates from Argentinean hospitals. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3945-9, 2003.
- 118 LOPEZ, E.; BLAZQUEZ, J. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on intrachromosomal homologous recombination in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3411-5, 2009.
- 119 CAVACO, L. M. *et al.* Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. **Microbial Drug Resistance**, v. 14, n. 2, p. 163-9, 2008.
- 120 BEN SALLEM, R. *et al.* IncI1 plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} or *bla*_{CMY-2} genes in *Escherichia coli* from healthy humans and animals in Tunisia. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 5, p. 495-500, 2014.
- 121 SOUFI, L. *et al.* Characterization of Pc Promoter Variants of Class 1 Integrons in *Escherichia coli* Isolates from Poultry Meat. **Foodborne Pathogens Disease**, v. 10, n. 12, p. 1075-7, 2013.
- 122 ELLER, C. *et al.* Emergence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) CTX-M-8 in Germany. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 1 2013.
- 123 KOGA, V. L. *et al.* Evaluation of the Antibiotic Resistance and Virulence of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chicken Carcasses in 2007 and 2013 from Parana, Brazil. **Foodborne Pathogens Disease**, v. 12, n. 6, p. 479-85, 2015.
- 124 PEIRANO, G. *et al.* Colonization of returning travelers with CTX-M-producing *Escherichia coli*. **Journal Travel Medicine**, v. 18, n. 5, p. 299-303, 2011.
- 125 COLLIGNON, P. *et al.* Human deaths and third-generation cephalosporin use in poultry, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 8, p. 1339-40, 2013.
- 126 LAZARUS, B. *et al.* Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 3, p. 439-52, 01 2015.
- 127 BONNET, R. *et al.* A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1936-42, 2000.
- 128 CERGOLE-NOVELLA, M. C. *et al.* First description of *bla*_{CTX-M-14}⁺ and *bla*_{CTX-M-15}-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 16, n. 3, p. 177-84, 2010.

- 129 BOTELHO, L. A. *et al.* Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 249-54, 2015.
- 130 KANG, C. I. *et al.* Outcomes and risk factors for mortality in community-onset bacteremia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, with a special emphasis on antimicrobial therapy. **Scandinavian Journal Infectious Diseases**, v. 45, n. 7, p. 519-25, 2013.
- 131 LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A. *et al.* Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. **Clinical Microbiology Infectious**, v. 17, n. 6, p. 873-80, 2011.
- 132 COTTELL, J. L. *et al.* Complete sequence and molecular epidemiology of IncK epidemic plasmid encoding *bla*_{CTX-M-14}. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. 645-52, 2011.
- 133 LINDSEY, R. L. *et al.* Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* by antimicrobial resistance profiles, plasmid replicon typing, and pulsed-field gel electrophoresis. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 2, p. 157-63, 2011.
- 134 OH, J. Y. *et al.* Isolation and epidemiological characterization of heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia fergusonii* from healthy chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 1-2, p. 170-5, 9 2012.
- 135 HIROI, M. *et al.* Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 2, p. 189-95, 2012.
- 136 FORGETTA, V. *et al.* Pathogenic and multidrug-resistant *Escherichia fergusonii* from broiler chicken. **Poultry Science**, v. 91, n. 2, p. 512-25, 2012.
- 137 GAASTRA, W. *et al.* *Escherichia fergusonii*. **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 1-2, p. 7-12, 6 2014.
- 138 CASELLA, T. *et al.* Detection of *bla*_{CTX-M-type} genes in complex class 1 integrons carried by *Enterobacteriaceae* isolated from retail chicken meat in Brazil. **International Journal Food Microbiology**, v. 197, p. 88-91, 16 2015.
- 139 GOUVÊA, R. *et al.* Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues:a review. **Revista . Brasileira. Ciencias. Avicola** , v. 17, p. 1-10, 2015.
- 140 SZMOLKA, A.; NAGY, B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. **Frontiers Microbiology**, v. 4, p. 258, 2013.

- ¹⁴¹ MATTIELLO, S. P. *et al.* Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* strains isolated from Brazilian poultry production. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 5, p. 1227-38, 2015.
- ¹⁴² WINOKUR, P. L. *et al.* Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45, n. 10, p. 2716-22, 2001.
- ¹⁴³ HIKI, M. *et al.* Diversity of plasmid replicons encoding the *bla*_{CMY-2} gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. **Foodborne Pathogens Disease**, v. 10, n. 3, p. 243-9, 2013.
- ¹⁴⁴ VOETS, G. M. *et al.* Identical plasmid AmpC beta-lactamase genes and plasmid types in *E. coli* isolates from patients and poultry meat in the Netherlands. **Int J Food Microbiology**, v. 167, n. 3, p. 359-62, 1 2013.
- ¹⁴⁵ DIERIKX, C. *et al.* Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3-4, p. 273-8, 26 2010.
- ¹⁴⁶ SIDJABAT, H. E. *et al.* Expansive spread of IncII plasmids carrying *bla*_{CMY-2} amongst *Escherichia coli*. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 3, p. 203-8, 2014.
- ¹⁴⁷ TAGG, K. A. *et al.* Distribution of acquired AmpC beta-lactamase genes in Sydney, Australia. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 83, n. 1, p. 56-8, 2015.
- ¹⁴⁸ DA COSTA, P. M.; LOUREIRO, L.; MATOS, A. J. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. **International Journal Environment Research Public Health**, v. 10, n. 1, p. 278-94, 2013.
- ¹⁴⁹ CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 8, p. 1028-46, 2009.
- ¹⁵⁰ STRAHILEVITZ, J. *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 664-89, 2009.
- ¹⁵¹ FORTINI, D. *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance and beta-lactamases in *Escherichia coli* from healthy animals from Nigeria. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 6, p. 1269-72, 2011.
- ¹⁵² OH, J. Y. *et al.* Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Wild Birds and Chickens in South Korea. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 1, p. 69-79, 2016.

- 153 CUNHA, M. P. *et al.* Coexistence of CTX-M-2, CTX-M-55, CMY-2, FosA3, and QnrB19 in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Poultry in Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 61, n. 4, 2017.
- 154 LOPEZ-CADENAS, C. *et al.* Enrofloxacin: pharmacokinetics and metabolism in domestic animal species. **Current Drug Metabolism**, v. 14, n. 10, p. 1042-58, 2013.
- 155 JURADO, S. *et al.* Resistance to non-quinolone antimicrobials in commensal *Escherichia coli* isolates from chickens treated orally with enrofloxacin. **Japan Journal Veterinary Research**, v. 63, n. 4, p. 195-200, 2015.
- 156 INGRAM, P. R. *et al.* Co-selection may explain high rates of ciprofloxacin non-susceptible *Escherichia coli* from retail poultry reared without prior fluoroquinolone exposure. **Journal Medical Microbiology**, v. 62, n. Pt 11, p. 1743-6, 2013.
- 157 TRAN, T. *et al.* Small plasmids harboring *qnrB19*: a model for plasmid evolution mediated by site-specific recombination at *oriT* and *Xer* sites. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 1821-7, 2012.
- 158 JACOBY, G. A.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D. C. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 5, 2014.
- 159 BELANGER, L. *et al.* *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 1-10, 2011.
- 160 CLERMONT, O. *et al.* Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infections Genetic Evolution**, v. 11, n. 3, p. 654-62, 2011.
- 161 STARCIC ERJAVEC, M.; ZGUR-BERTOK, D. Virulence potential for extraintestinal infections among commensal *Escherichia coli* isolated from healthy humans--the Trojan horse within our gut. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 5, 2015.
- 162 BERMAN, H. *et al.* Distribution of strain type and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates causing meningitis in a large urban setting in Brazil. **Journal Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1418-22, 2014.
- 163 CHEN, Y. *et al.* Serotypes, genotypes and antimicrobial resistance patterns of human diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolates circulating in southeastern China. **Clinical Microbiology Infectious**, v. 20, n. 1, p. 52-8, 2014.
- 164 MALUTA, R. P. *et al.* Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra-intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105016, 2014.

- 165 GUO, S. *et al.* Human-associated fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clonal lineages, including ST354, isolated from canine feces and extraintestinal infections in Australia. **Microbes Infectious**, v. 17, n. 4, p. 266-74, 2015.
- 166 MORA, A. *et al.* Emergence of clonal groups O1:HNM-D-ST59, O15:H1-D-ST393, O20:H34/HNM-D-ST354, O25b:H4-B2-ST131 and ONT:H21,42-B1-ST101 among CTX-M-14-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Galicia, northwest Spain. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 1, p. 16-21, 2011.
- 167 A., R. *et al.* Comparative Genomics of *Escherichia coli* Isolated from Skin and Soft Tissue and Other Extraintestinal Infections. **mBio**, v. 8, 2017.
- 168 TCHESNOKOVA, V. *et al.* Type 1 fimbrial adhesin FimH elicits an immune response that enhances cell adhesion of *Escherichia coli*. **Infectious Immunity**, v. 79, n. 10, p. 3895-904, 2011.
- 169 KUEHN, M. J. *et al.* P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. **Nature**, v. 356, n. 6366, p. 252-5, 19 1992.
- 170 CERGOLE-NOVELLA, M. C.; PIGNATARI, A. C.; GUTH, B. E. Adhesion, biofilm and genotypic characteristics of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 167-71, 2015.
- 171 DENISUIK, A. J. *et al.* Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-, AmpC beta-lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007-11. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68 Suppl 1, p. i57-65, 2013.
- 172 VINCENT, C. *et al.* Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 88-95, 2010.