RALF BRUNO MOURA LOPES

ENTEROBACTERIACEAE ENDOFÍTICAS PRODUTORAS DE β-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO EM HORTALIÇAS COMERCIAIS

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

São Paulo 2019

Ralf Bruno Moura Lopes

Enterobacteriaceae endofíticas produtoras de β-lactamases de espectro estendido em hortaliças comerciais

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman

Versão original

São Paulo 2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Lopes, Ralf Bruno Moura Enterobacteriaceae endofíticas produtoras de betalactamases de espectro estendido em hortaliças comerciais / Ralf Bruno Moura Lopes; orientador Nilton Erbet Lincopan Huenuman. -- São Paulo, 2019. 90 p. Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. Enterobacteriaceae. 2. CTX-M. 3. WGS. 4. Hortaliças. 5. Segurança alimentar. I. Huenuman, Nilton Erbet Lincopan, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ralf Bruno Moura Lopes

Título da Tese: *Enterobacteriaceae* endofíticas produtoras de β-lactamases de espectro estendido em hortaliças comerciais

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...., considerou o(a) candidato(o):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantá, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **756/2015** referente ao projeto intitulado: *"Enterobactérias endofíticas multirresistentes de culturas agronômicas: incidência, fitness durante a colonização e métodos de controle"* sob a responsabilidade de Ralf Bruno Moura Lopes e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Nilton Erbet Lincopan Huenuman**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 15 de setembro de 2015

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes** Coordenador da CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto** Coordenador da CEPSH ICB/USP

Dedico esta tese a meus pais, Ademilson e Rosângela, pelo amor e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ademilson e Rosângela, pelo amor, ensinamentos de vida e todo o apoio ao longo da trajetória acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa regular no país e pela bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) concedidas. "O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), pela formação e pela estrutura durante o Doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pela formação, pela estrutura e por intermediar vários processos importantes durante o curso, especialmente o PDSE e o apoio à participação em congressos.

À Universidade de Aveiro, pela estrutura, pela excelente receptividade e por me permitir complementar as atividades do Doutorado.

Ao professor Nilton Lincopan, pela orientação, pela oportunidade e pelo apoio para a realização deste trabalho.

À professora Isabel Henriques, pela orientação, por ter me recebido de forma tão calorosa no Microlab durante o período de estágio sanduíche e por todo o apoio para que o trabalho pudesse andar da melhor forma possível.

Aos professores Welington Araújo, Ana Marcia e Doroti Garcia pelos aconselhamentos e sugestões durante o exame de qualificação.

A todas as colegas do Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas (ICB/USP), Miriam, Louise, Quézia, Helena, Maria, Brenda, Luciana, Fernanda, Luana pela convivência, amizade e apoio durante vários momentos para a execução da pesquisa. A todos os colegas, em especial ao Rafael Tavares, da grande equipe do Microlab, pela convivência, amizade, preocupação com a minha adaptação e bem estar em Portugal, além do apoio para a execução da pesquisa.

Aos colegas do ICB, em especial aos do Laboratório de Genética Molecular Bacteriana e do Laboratório de Fisiologia e Genética Bacteriana, principalmente ao Frank ("Amigão"), Letícia, Marco, Marina, Rúbia, pela ótima convivência, amizade e por terem sido um porto seguro.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, pela ajuda constante.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

"... o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante".

(Augusto Branco)

RESUMO

LOPES, R. B. M. *Enterobacteriaceae* endofíticas produtoras de β-lactamases de espectro estendido em hortaliças comerciais. 2019. 90 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A disseminação de bactérias produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) é um desafio que não está mais restrito aos ambientes hospitalares, mas também representa um problema crescente que envolve segurança alimentar e integridade ambiental. Neste estudo, foi realizada a investigação de bactérias endofíticas produtoras de ESBL isoladas de hortaliças comercializadas no Brasil e em Portugal. A caracterização genômica dos isolados foi realizada por WGS e o estilo de vida endofítico foi avaliado utilizando o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) como modelo para o estudo. Linhagens endofíticas de Escherichia coli (ST38, ST648, ST4012), Klebsiella pneumoniae (ST198, ST2739) e Enterobacter cloacae (ST927) produtoras de CTX-M-15 foram isoladas de espinafre, repolho, rúcula e alface do Brasil. E. coli (ST10 e ST novo) produtoras de CTX-M-14 foram isoladas de alface e agrião de Portugal. As linhagens avaliadas colonizaram eficientemente o interior da raiz e da parte aérea das plantas do feijoeiro, confirmando a capacidade de estilo de vida endofítico. A análise dos genomas revelou genes de resistência aos beta-lactâmicos (bla_{CTX-M-14}, bla_{CTX-M-15}, bla_{TEM-1B}, bla_{SHV-11}, bla_{SHV-28}, bla_{OXA-1}, bla_{ACT}), aminoglicosídeos (strA, strB, aac(3)-II, aac(6')Ib-cr, aadA1, aadA2, aadA5, aadA12, aph(3")-Ib, aph(6)-Id), (fluoro)quinolonas (aac(6')Ib-cr, qnrB, oqxA, oqxB), fenicóis (catA1, catB3, cmlA1, floR), tetraciclinas (tetA, tetB, tetX), macrolídeos (ermB, mphA, mdfA), trimetoprima (dfrA14, dfrA15, dfrA17), sulfonamidas (sul1, sul2) e fosfomicina (fosA), bem como mutações em regiões determinantes de resistência às (fluoro)quinolonas. Múltiplos genes associados à virulência para animais e seres humanos foram encontrados, sendo E. coli ST38, ST648 e ST novo pertencentes ao altamente virulento filogrupo D, enquanto E. coli ST10 e ST4012 foram atribuídas ao filogrupo A de baixa virulência. Genes que favorecem a associação bacteriana com plantas também foram identificados nas linhagens endofíticas. Para todas as linhagens isoladas de amostras brasileiras, plasmídeos carreadores de *bla*_{CTX-M-15} pertenceram ao IncF ou IncHI2A e foram transferíveis horizontalmente. Para as linhagens de E. coli isoladas de amostras portuguesas, plasmídeos carreadores de bla_{CTX-M-14} pertenceram ao IncI1 e foram transferíveis em duas das três linhagens. Em K. pneumoniae ST198, o plasmídeo IncF, denominado pKP301cro (147,4 kb), também carreou os clusters gênicos cusSRCFBA, copABCDRSE e arsRDABC codificadores de resistência à prata/cobre, cobre e arsênio, respectivamente. Finalmente, além do contexto genético internacional ISEcp1-bla_{CTX-M-15}orf477, dois novos contextos de bla_{CTX-M-15} foram encontrados em E. coli ST38 e ST4012. Em conclusão, hortaliças podem representar uma possível rota para a disseminação de bactérias, incluindo clones internacionais, carreadoras de genes de resistência clinicamente significantes para seres humanos e animais, representando uma séria ameaça à saúde pública.

Palavras-chave: *Enterobacteriaceae*, ESBL, CTX-M, WGS, hortaliças, segurança alimentar.

ABSTRACT

LOPES, R. B. M. **Extended-spectrum** β-lactamase-producing endophytic *Enterobacteriaceae* in commercial vegetables. 2019. 90 p. Ph.D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The dissemination of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing bacteria is a challenge that is no longer restricted to hospital settings but also represents a growing problem involving environmental and food safety. In this study, the investigation of ESBLproducing endophytic bacteria isolated from vegetables marketed in Brazil and Portugal was carried out. Genomic characterization of the isolates was performed by WGS and the endophytic lifestyle was evaluated using common bean (*Phaseolus vulgaris*) as the model for the study. Escherichia coli (ST38, ST648, ST4012), Klebsiella pneumoniae (ST198, ST2739), and Enterobacter cloacae (ST927) endophytic strains producing CTX-M-15 were isolated from spinach, cabbage, arugula, and lettuce from Brazil. CTX-M-14producing E. coli (ST10 and new ST) strains were isolated from lettuce and watercress from Portugal. Evaluated strains efficiently colonised the interior of the common bean roots and shoots, confirming their endophytic lifestyle. Genome analysis revealed resistance genes to beta-lactams (*bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1B}, *bla*_{SHV-11}, *bla*_{SHV-28}, bla_{OXA-1}, bla_{ACT}), aminoglycosides (strA, strB, aac(3)-II, aac(6')Ib-cr, aadA1, aadA2, aadA5, aadA12, aph(3")-Ib, aph(6)-Id), (fluoro)quinolones (aac(6')Ib-cr, qnrB, oqxA, oqxB), phenicols (catA1, catB3, cmlA1, floR), tetracyclines (tetA, tetB, tetX), macrolides (ermB, mphA, mdfA), trimethoprim (dfrA14, dfrA15, dfrA17), sulfonamides (sul1, sul2), and fosfomycin (fosA), as well as mutations in quinolone resistance-determining regions. Multiple virulence-associated genes for animals and humans were found, with E. coli ST38, ST648 and new ST belonging to the highly virulent phylogroup D, while E. coli ST10 and ST4012 were attributed to low virulence phylogroup A. Genes that favor bacterial association with plants were also identified in endophytic strains. For all strains isolated from Brazilian samples, plasmids carrying bla_{CTX-M-15} belonged to IncF or IncHI2A and were horizontally transferable. For E. coli strains isolated from Portuguese samples, plasmids carrying *bla*_{CTX-M-14} belonged to IncI1 and were transferable from two of three strains. In K. pneumoniae ST198, IncF plasmid, designated pKP301cro (147.4 kb), also harbored cusSRCFBA, copABCDRSE, and arsRDABC gene clusters encoding resistance to silver/copper, copper, and arsenic, respectively. Finally, in addition to the international ISEcp1-bla_{CTX-M-15}-orf477 genetic context, two novel contexts of bla_{CTX-M-15} were identified in endophytic E. coli ST38 and ST4012 strains. In conclusion, vegetables can represent a possible route for the dissemination of bacteria, including international clones, carrying clinically significant resistance genes for humans and animals, posing a serious threat to public health.

Keywords: Enterobacteriaceae, ESBL, CTX-M, WGS, vegetables, food safety.

LISTA DE FIGURAS

 Figura 8. (a) Comparação de plasmídeos IncF carreadores de genes de β-lactamases. Baixas identidades (70%-50%) são indicadas por tons mais claros das cores. Identidades <50% aparecem como espaços em branco. Rosa, pLGP4 (GenBank: MF116002.1); verde, p6234-198.371kb (GenBank: CP010390.1); amarelo, pKPSH11 (GenBank: KT896504.1); azul, pKP301cro (GenBank: KY495890.1); e roxo, pKPN3-307_typeD (GenBank: KY271407.1) são plasmídeos de bactéria não cultivável e linhagens de K. pneumoniae isoladas de fluido corporal, água residual, alface e aspirado brônquico, respectivamente. Arcos pretos representam elementos transponíveis de pKP301cro. (b) Comparação de pKP301cro e p6234-198.371kb. O sombreamento cinza indica regiões de homologia, enquanto o sombreamento azul indica regiões homólogas invertidas. Sequências codificadoras de proteínas são representadas por setas pretas. (c) Região mostrando a genes de resistência a prata/cobre (cusSRCFBA) (azul), ligação de cobre (copE2ABCDRSE1) (laranja), arsênio (arsRDABC) (verde) e β-lactâmicos (bla_{CTX-M-15}, bla_{TEM-1} e/ou bla_{OXA-1}) (vermelho) em diferentes plasmídeos de K. pneumoniae; pRJ119-NDM1 (GenBank: KX636095.1). Sequências codificadoras de proteínas com outras funções são mostradas em cinza. As coordenadas das regiões mostradas são indicadas entre

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das β-lactamases (Bush e Jacoby, 2010)26								
Tabela 2. Densidades mais altas de bactérias endofíticas gram-negativas não suscetíveis àceftriaxona ou à cefotaxima								
Tabela 3. Porcentagem de resistência de isolados endofíticos do Brasil (n=120) e de Portugal (n=90) aos principais antimicrobianos avaliada pelo teste de disco-difusão em ágar								
Tabela4.PerfilfenotípicoderesistênciaantimicrobianadelinhagensdeEnterobacteriaceaeendofíticasprodutorasdeESBL, transformantes, transconjugantesereceptoras								
Tabela 5. CIM de antimicrobianos para enterobactérias endofíticas produtoras de ESBL isoladas no Brasil								
Tabela 6. CIM de antimicrobianos para linhagens de <i>E. coli</i> endofíticas produtoras deESBL isoladas em Portugal, transconjugantes e receptora								
Tabela 7. Densidade das linhagens endofíticas produtoras de CTX-M recuperadas da raiz eda parte aérea do feijoeiro comum após 15 dias da inoculação								
Tabela 8. Resumo dos dados da construção das bibliotecas e montagem dos genomas deenterobactérias endofíticas								
Tabela 9. Características genômicas de Enterobacteriaceae endofíticas multirresistentesprodutoras de CTX-M								

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AC Ácido clavulânico
- AMC Amoxacilina/ácido clavulânico
- AMK Amicacina
- AMO Amoxicilina
- AMP Ampicilina
- ATM Aztreonam
- AZI Azida
- BLAST Basic Local Alignment Tool
- BOX Elementos BOX
- CAZ Ceftazidima
- CC Complexo Clonal
- CEC Cefaclor
- CEFAP Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa
- CEP Cefalotina
- CFM Cefixima
- CFO Cefoxitina
- CHL Cloranfenicol
- CIM Concentração inibitória mínima
- CIP Ciprofloxacina
- CLSI Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
- CPM Cefepima
- CRO Ceftriaxona
- CTF-Ceftiofur
- CTX Cefotaxima
- CZL Ceftazidima/ácido clavulânico
- DNA Ácido desoxirribonucléico
- dNTP Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- DO Densidade Óptica
- DOX Doxiciclina
- DP Desvio padrão
- ENO-Enrofloxacina
- ERIC- Sequências consenso repetitivas intergênicas de enterobactérias

- ESBL Beta-lactamase de espectro estendido
- ETP-Ertapenem
- EUCAST Comitê Europeu de Avaliação de Suscetibilidade Antimicrobiana
- GEN Gentamicina
- IPM-Imipenem
- IMP Imipenemase
- INC-Incompatibilidade
- IS Sequência de inserção
- KAN Canamicina
- KPC Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemase
- LB Luria Bertani
- LVX Levofloxacina
- MLST Tipagem por sequenciamento de multilocus
- MS Murashige e Skoog
- MXF Moxifloxacina
- NAL Ácido Nalidíxico
- $NDM New Delhi metalo-\beta$ -lactamase
- NOR Norfloxacina
- NT Não tipado
- PCR Reação em cadeia da polimerase
- PEF Pefloxacina
- PGAP Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline
- PIP Piperacilina
- PTZ Piperacilina/tazobactam
- RDRQ Regiões determinantes de resistência às quinolonas
- RIF Rifampicina
- SPM-1 São Paulo metalo- β -lactamase-1
- ST Sequência tipo
- STR Estreptomicina
- SUL-Sulfonamidas
- SXT-Sulfametoxazol/trimetoprima
- TC Transconjugante
- TET Tetraciclina
- TF-Transformante

TIG – Tigeciclina

TMO – Temocilina

TOB – Tobramicina

TZB – Tazobactam

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

- β Beta
- Δ Delta
- ° Graus
- $\mu Micro$
- % Porcentagem
- C-Celsius
- g-Grama
- h-Hora
- kb Quilobase
- mg-Miligrama
- $\min-Minuto$
- ml-Mililitro
- mm Milímetro
- mM-Milimolar
- ng Nanograma
- nm Nanômetro
- pb Par de base
- p/v Peso/volume
- rpm Rotação por minuto
- U Unidade de enzima
- UFC Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. A disseminação da resistência a antimicrobianos: uma ameaça para uma crise de	e saúde
pública	22
2.2. Plasmídeos e a transferência conjugativa de genes de resistência	24
2.3. β-lactâmicos e β-lactamases	25
2.3.1. AmpCs	26
2.3.2. ESBLs	27
2.3.3. Carbapenemases	29
2.4. O solo como um reservatório de bactérias multirresistentes	31
2.5. Papel dos vegetais na disseminação de patógenos, incluindo bactérias multirre	esisten-
tes	33
2.6. Bactérias endofíticas	35
3. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivo geral	39
3.2. Objetivos específicos	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. Coleta das amostras vegetais	40
4.2. Isolamento de bactérias endofíticas	40
4.3. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos	41
4.3.1. Teste de disco-difusão em ágar	41
4.3.2. Detecção fenotípica de ESBL	41
4.3.3. Concentração inibitória mínima (CIM)	42
4.4. Detecção de genes <i>bla</i> _{CTX-M}	42
4.5. Dinâmica do estilo de vida endofítico de enterobactérias produtoras de ESBL	42
4.6. Fingerprinting genômico por PCR de sequências consenso repetitivas intergên	icas de
enterobactérias (ERIC-PCR) e de elementos BOX (BOX-PCR)	43
4.7. Determinação de filogrupos de <i>E. coli</i>	44
4.8. Transferência horizontal de plasmídeos de resistência	44
4.8.1. Conjugação	44
4.8.2. Transformação de <i>E. coli</i> TOP10 por choque térmico	44
4.9. Construção das bibliotecas e sequenciamento genômico	44

4.10. Montagem e anotação de genomas45
4.11. Análise do resistoma, viruloma, tipagem, elementos genéticos móveis e genes que
favorecem a associação com plantas45
4.12. Análise estatística
5. RESULTADOS
5.1. Isolamento bacteriano
5.2. Padrões de suscetibilidade antimicrobiana de bactérias endofíticas
5.3. Bactérias endofíticas multirresistentes produtoras de ESBL49
5.4. Estilo de vida endofitico de enterobactérias produtoras de CTX-M-1554
5.5. Genotipagem, resistoma, viruloma e genes que favorecem a associação com plantas .54
5.6. Plasmídeos e transferência horizontal
5.7. Contextos genéticos de <i>bla</i> _{CTX-M-15}
6. DISCUSSÃO
7. CONCLUSÕES
REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO

Um dos mecanismos mais importantes de resistência aos antimicrobianos em bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* é a produção de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) mediada por plasmídeos. As enterobactérias multirresistentes produtoras de ESBL têm se tornado um desafio frente ao tratamento de infecções e constituem um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo. As principais ESBLs são dos tipos CTX-M, TEM e SHV (Bush e Jacoby, 2010; Hemlata et al., 2016), das quais as mais prevalentes são as enzimas CTX-M, codificadas pelas variantes do gene *bla*_{CTX-M} (Cantón et al., 2012). Nos dias atuais, CTX-M-15 é a ESBL de maior importância clínica e tem substituído outras variantes em muitas partes do mundo (Bevan et al., 2017).

Interessantemente, *Kluyvera ascorbata*, uma bactéria comumente encontrada na rizosfera, foi proposta como a fonte original de genes bla_{CTX-M} , mobilizados por sequências de inserção tais como IS26 e IS*Ecp1* (Humeniuk et al., 2002). Após a mobilização inicial de bla_{CTX-M} para plasmídeos, esses genes então se disseminaram entre bactérias gramnegativas, em que a ubiquidade das enterobactérias contribuiu grandemente para a sua rápida disseminação global (Cantón et al., 2006; Lu et al., 2010; Carattoli, 2013)

De fato, estudos epidemiológicos têm mostrado nos últimos anos que a disseminação de bactérias produtoras de ESBL não é um problema restrito aos hospitais, mas também se estende à segurança alimentar e à integridade ambiental (Cantas et al., 2013; Ur Rahman et al., 2018). Assim, desde ao início da década de 2000, as taxas de detecção de produtores de ESBL, principalmente do tipo CTX-M, na comunidade têm aumentado. Além disso, vários fatores, como fontes ambientais, alimentos de origem animal e migração humana, aceleram a disseminação global de bactérias produtoras de ESBL (Chong et al., 2018).

As culturas agrícolas também podem ser contaminadas por fontes ambientais, animais ou humanas (Olaimat e Holley, 2012). Ambientes aquáticos, por exemplo, que podem constituir uma importante fonte de contaminação, têm sido reportados como reservatórios de linhagens bacterianas de alto risco produtoras de CTX-M (Nascimento et al., 2017). Dessa maneira, bactérias multirresistentes têm sido cada vez mais relatadas em vegetais comerciais nos últimos anos (Reuland et al., 2014; Zurfluh et al., 2015; Hölzel et al., 2018). Da mesma forma, surtos de doenças causadas por linhagens altamente virulentas associadas ao consumo de vegetais crus também têm sido descritos com maior frequência. Um exemplo é o recente surto causado por *Escherichia coli* O157:H7 relacionado ao

consumo de alface romana, envolvendo 210 casos de doença e cinco mortes na América do Norte em 2018 (<u>https://www.cdc.gov/ecoli/2018/o157h7-04-18/index.html</u>). Nesse contexto, a veiculação de patógenos multirresistentes por vegetais frescos é uma questão preocupante de segurança alimentar, uma vez que a demanda global por vegetais utilizados na alimentação é crescente, principalmente devido à maior preocupação dos consumidores em se manterem saudáveis e com uma dieta equilibrada.

Embora enterobactérias, como *E. coli, Enterobacter cloacae* e *Klebsiella* spp., estejam frequentemente associados com plantas (Shankar et al., 2011; Dublan et al., 2014; Reyna-Flores et al., 2018), pouco se conhece sobre o risco real de bactérias produtoras de ESBL em vegetais frescos e muito menos sobre bactérias endofíticas com essa característica. As bactérias endofíticas colonizam os tecidos internos de plantas sem causar danos aparentes ao vegetal (Hallmann et al., 1997; Lopes et al., 2015) e podem representar um modo silencioso de disseminação de bactérias multirresistentes e determinantes de resistência para a microbiota humana e animal. Neste estudo, foi realizada uma investigação genômica de bactérias endofíticas produtoras de ESBL isoladas de vegetais comercializados no Brasil e em Portugal, dois países com alta prevalência de ESBL, estreitas relações culturais e frequente fluxo migratório entre ambos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A disseminação da resistência a antimicrobianos: uma ameaça para uma crise de saúde pública

Bactérias multirresistentes aos antimicrobianos têm se tornado um grande desafio para o controle de infecções em humanos e animais e constituem um dos maiores problemas de saúde pública global. Essas bactérias estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade, além de elevados custos hospitalares. Caso não sejam tomadas medidas restritivas, estima-se que o aumento da resistência resultará em 10 milhões de mortes de pessoas anualmente até 2050 (O'Neill, 2014) (Figura 1).



Figura 1. Número de mortes estimadas anualmente devido às infecções por bactérias multirresistentes até 2050 (O'Neill, 2014).

A emergência de bactérias multirresistentes está estreitamente relacionada ao uso excessivo e inadequado de antimicrobianos nas práticas médica e veterinária, bem como na produção agropecuária (Schwaber et al., 2006; Lye et al., 2012). Bactérias gram-negativas, especialmente aquelas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são as mais relacionadas à resistência antimicrobiana devido à diversidade de mecanismos de resistência que apresentam e à facilidade de disseminação dos genes presentes em diferentes elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos e transposons (El Salabi et al., 2013).

Nos últimos anos, estudos epidemiológicos têm mostrado que a disseminação de bactérias multirresistentes não é um problema restrito aos hospitais, mas um desafio crescente, estendendo-se também para a segurança alimentar e integridade ambiental. Além disso, diversas atividades antropogênicas, como o descarte inadequado de esgoto sanitário e efluente industrial, podem carrear antimicrobianos e bactérias multirresistentes, contaminando o meio ambiente e criando grandes reservatórios ambientais de bactéria as resistentes (Figura 2) (Hall et al., 2015; Woolhouse et al., 2015). De fato, desde o início



Figura 2. Principais reservatórios clínicos e ambientais de bactérias multirresistentes a antimicrobianos. A comunidade humana constitui um reservatório de bactérias multirresistentes e também é frequentemente exposta a outros reservatórios. Cada reservatório está incluindo em um contorno tracejado, dentro dos quais pode ocorrer a transmissão cruzada de bactérias multirresistentes. As setas mostram o fluxo dessas bactérias de um reservatório para outro. Além de nos hospitais, no meio ambiente também ocorrem trocas de material genético entre bactérias de origem clínica e/ou ambiental, resultando na disseminação de genes de resistência (Woerther et al., 2013).

dos anos 2000, a detecção de bactérias multirresistentes na comunidade (pacientes ambulatoriais, portadores saudáveis, animais doentes e saudáveis, produtos alimentícios) têm aumentado (Chong et al., 2018), enquanto vários fatores interligados, como transferência horizontal de genes, expansão de clones bacterianos, alimentos de origem animal, fontes ambientais e migração humana, aceleram a disseminação global de bactérias multirresistentes (Bevan et al., 2017; Chong et al., 2018).

2.2. Plasmídeos e a transferência conjugativa de genes de resistência

Plasmídeos são elementos genéticos extracromossômicos, circulares ou lineares, com capacidade de replicação autônoma (Leplae et al., 2004). Ainda que a replicação dos plasmídeos seja independente da replicação do cromossomo, ela é dependente das mesmas enzimas que replicam o genoma da célula hospedeira. Além disso, eles geralmente não possuem genes essenciais para o crescimento da célula em ausência de estresse (Nordstrom, 2006). Por outro lado, os plasmídeos apresentam um importante papel na adaptação e na evolução bacteriana, mediando a transferência de genes entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes (Hall, 2012; Partridge et al., 2009).

Os plasmídeos podem ser classificados com base em diferentes critérios, incluindo tamanho, número de cópias na célula, capacidade de transferência e grupo de incompatibilidade (Shintani et al., 2015). Nesse sentido, os plasmídeos podem variar de cerca de 1 a 1000 kb, serem encontrados em cópia única ou em centenas de cópias na célula (como o pIJ101 de *Streptomyces* spp.), serem conjugativos, mobilizáveis ou não serem transferíveis, e apresentarem ou não a capacidade de se manterem juntos em uma linhagem celular (Pinto et el., 2012; Shintani et al., 2015).

Os plasmídeos frequentemente são carreadores de genes de resistência a antimicrobianos e podem mediar a disseminação desses genes principalmente por meio da conjugação. O processo de conjugação depende da formação de longos apêndices na superfície da célula doadora, chamados de pilus sexuais. Quando a extremidade do pilus sexual estabelece uma conexão estável com a célula receptora, aparentemente pela interação com um sítio-específico na superfície dessa célula, ocorre a contração do pilus, aproximando as duas bactérias. Em seguida, há a formação de uma ponte citoplasmática entre as células associadas e a subsequente transferência do plasmídeo por um mecanismo de replicação do tipo círculo-rolante (Pinto et el., 2012; Koraimann e Wagner et al., 2014). Os plasmídeos conjugativos são geralmente grandes (>40 kb), de baixo número de cópias e contêm todos os genes necessários para a conjugação, os genes *tra*, os quais são em torno

de trinta e são responsáveis pela formação do pilus sexual, pelo reconhecimento entre células conjugativas, pela transferência do DNA e pela regulação do processo de conjugação (Koraimann e Wagner et al., 2014).

Com relação à classificação em grupos de incompatibilidade, ela tem tido importante utilidade epidemiológica. Plasmídeos que possuem a mesma origem de replicação e, por isso, têm os mesmos mecanismos de regulação do número de cópias, são considerados incompatíveis (pertencem ao mesmo Inc) e não podem permanecer na mesma linhagem celular (Novick, 1987). Atualmente, são conhecidos mais de trinta grupos de incompatibilidade plasmidial em enterobactérias, dos quais os mais prevalentes são os das famílias IncF, IncA/C, IncL/M, IncI1, IncHI2 e IncN. Esses plasmídeos têm sido mundialmente descritos em bactérias de diferentes gêneros e fontes, sendo, portanto, considerados epidêmicos. Além disso, plasmídeos desses grupos de incompatibilidade estão mais frequentemente associados com genes de resistência específicos (Carattoli, 2009; Carattoli, 2013).

2.3. β -lactâmicos e β -lactamases

Os β -lactâmicos constituem os antimicrobianos mais empregados na prática clínica e também incluem alguns utilizados como último recurso para o tratamento de infecções graves (Van Boeckel et al., 2014; Mirakian et al., 2015). Os β -lactâmicos compreendem as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenêmicos, e a produção de β lactamases, tais como AmpC, β -lactamase de espectro estendido (ESBL) e carbapenemase, é o principal mecanismo de resistência a esses antimicrobianos (Mirakian et al., 2015).

As β -lactamases são expressas em vários níveis e diferem de forma significativa, tanto em relação às características bioquímicas quanto em relação à sua atividade contra β -lactâmicos específicos. O nível de expressão, as propriedades enzimáticas e a associação frequente com outros mecanismos de resistência, como bombas de efluxo e alteração da permeabilidade da membrana externa bacteriana, resultam em uma ampla gama de fenótipos de resistência (Bonomo et al., 2017).

Além disso, as β -lactamases podem ser classificadas molecularmente, com base na sequência de aminoácidos (Ambler et al., 1991), ou funcionalmente, com base nos perfis dos inibidores e dos substratos (Bush e Jacoby, 2010) (Tabela 1).

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

Tabela 1. Classificação das β-lactamases (Bush e Jacoby, 2010).

AC, ácido clavulânico; TZB, tazobactam.

2.3.1. AmpCs

As β-lactamases do tipo AmpC são enzimas que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas (incluindo as de terceira geração, mas geralmente não as de quarta) e monobactâmicos (Jacoby, 2009). Diversas bactérias da família *Enterobacteriaceae* e outros bacilos gram-negativos produzem AmpC intrínseca, seja constitutivamente em um nível mínimo, como *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*, ou por indução, como *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* e *Pseudomonas aeruginosa* (Kaye et al., 2001; Jacoby, 2009). No entanto, a desrepressão ou hiperprodução de AmpC

As AmpCs também podem ocorrer como enzimas adquiridas (plasmidiais), principalmente nas enterobactérias. Diversos tipos de genes que codificam diferentes AmpCs plasmidiais já foram descritos, os quais são provenientes de produtores naturais, tais como aqueles dos grupos *Enterobacter* (codificadores de AmpCs dos tipos MIR e ACT), *Citrobacter freundii* (CMY-2-*like*, LAT, FCE), *Morganella morganii* (DHA), *Hafnia alvei* (ACC), *Aeromonas* (CMY-1-*like*, FOX, MOX) e *Acinetobacter baumannii* (ABA) (Philippon et al., 2002; Jacoby, 2009). As mais comuns e amplamente disseminadas AmpCs adquiridas são as enzimas CMY-2-*like*, embora DHA-*like* induzíveis e algumas outras também tenham se expandido (Empel et al, 2010; Sidjabat et al., 2014). Exceto para alguns tipos induzíveis, como DHA, as AmpCs adquiridas são em geral expressas constitutivamente, conferindo resistência semelhante àquela observada em mutantes desreprimidos ou hiperprodutores (Jacoby, 2009).

Isolados produtores de AmpC adquirida foram recuperados tanto a partir de pacientes hospitalizados quanto da comunidade, além de animais de produção e produtos alimentícios (Jacoby, 2009; Sidjabat et al., 2014). Embora as AmpCs adquiridas tenham se disseminado e sido reportadas em estudos multicêntricos de resistência de enterobactérias às cefalosporinas de terceira geração, a sua frequência global é notavelmente abaixo daquela das ESBLs (Philippon et al., 2002; Sidjabat et al., 2014). Por outro lado, em alguns locais e situações epidemiológicas específicas, o significado de bactérias produtoras de AmpC pode aumentar de forma substancial (Empel et al, 2010; D'Andrea et al., 2011).

2.3.2. ESBLs

A produção de ESBL é um dos mecanismos mais importantes de resistência aos antimicrobianos em bactérias gram-negativas. Essas enzimas são capazes de hidrolisar a maioria das penicilinas e cefalosporinas, incluindo compostos oximino- β -lactâmicos (cefuroxima, cefalosporinas de terceira e quarta geração e aztreonam), mas não cefamicinas e carbapenêmicos (Bush et al., 1995; Ghafourian et al., 2015).

Os principais tipos de ESBLs são CTX-M, SHV e TEM (Ghafourian et al., 2015), enquanto outras, tais como GES, PER e VEB, têm sido reportadas com menor frequência (Naas et al., 2008; Villegas et al., 2008; Nogueira et al., 2015). As primeiras linhagens produtoras de ESBL foram identificadas no início da década de 1980 (Kliebe et al., 1985) e, desde então, têm sido detectadas em todo o mundo (Chong et al., 2018). No Brasil, a primeira descrição de produção de ESBLs em enterobactérias foi feita em 1997, em isolados clínicos de *K. pneumoniae* em São Paulo e Rio de Janeiro (Gales et al., 1997). Nesse mesmo ano, foram identificados isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de ESBLs em 18 hospitais de quatro diferentes estados brasileiros (Sader et al., 1997). No ano 2000, foi publicado o primeiro estudo envolvendo caracterização molecular de ESBLs no Brasil. Foram identificadas a variante CTX-M-2 e, pela primeira vez no mundo, a variante CTX-M-8, em enterobactérias de diferentes espécies isoladas de hospitais do Rio de Janeiro (Bonnet et al., 2000). Desde então, diversas variantes de CTX-M têm sido detectadas tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade. Atualmente, as ESBLs mais prevalentes no Brasil e em muitas partes do mundo são do tipo CTX-M, das quais CTX-M-15 é a mais importante clinicamente e tem substituído outras variantes (Rocha et al., 2016; Bevan et al., 2017; Chong et al., 2018). Outras CTX-M-59 (Rocha et al., 2016) (Figura 3).



Figura 3. Distribuição de ESBLs no Brasil. ESBLs realçadas em negrito foram encontradas em bactérias isoladas de animais; não realçadas, de humanos; sublinhadas, de ambos. A figura foi construída com base em estudos prévios (Silva e Lincopan, 2012; Guzmán-Blanco et al., 2014; Nogueira et al., 2015; Rocha et al., 2016) e sequências pesquisadas no *GenBank* (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/</u>) até 16 de julho de 2019.

Atualmente, são conhecidas mais de 170 variantes de CTX-M (Lahey, 2016), as quais estão divididas em cinco principais grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. Esta divisão é baseada na similaridades da sequências de aminoácidos, em que enzimas pertencentes a um mesmo grupo compartilham >94% de identidade, (Bonnet, 2004). *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são as espécies mais frequentemente associadas à produção de ESBL, embora diversas outras espécies também têm sido comumente relatadas como produtoras dessas enzimas (Zhao e Hu, 2013). A prevalência de isolados produtores de ESBL depende de uma série de fatores, incluindo a espécie bacteriana, a localidade geográfica, o hospital, a ala hospitalar, o período do estudo, o grupo de pacientes e o tipo de infecção. Grandes variações têm sido relatadas em diferentes estudos (Livermore, 1995; Bradford, 2001; Livermore, 2007; Chong et al., 2018).

A maioria das ESBLs é representada por enzimas adquiridas e investigações epidemiológicas revelaram uma relação estreita entre genes codificadores de CTX-M (bla_{CTX-M}) e plasmídeos dos IncF, IncI, IncN, IncHI2, IncL/M e IncK (Carattoli, 2009; Zhao e Hu, 2013; Carattoli, 2013). O grupo IncF (FIA, FIB e FII) é o mais frequentemente envolvido na disseminação de $bla_{CTX-M-15}$, enquanto IncF, IncK e IncI1 podem estar muitas vezes associados a $bla_{CTX-M-14}$. Adicionalmente, em geral, $bla_{CTX-M-1}$ é carreado por IncI1 e IncN; $bla_{CTX-M-3}$ por IncI1 e IncL/M; e $bla_{CTX-M-9}$ por IncHI2 (Zhao e Hu, 2013). A grande capacidade de disseminação de bla_{CTX-M} é ainda favorecida pela associação desses genes com determinados elementos transponíveis nos plasmídeos, como as sequências de inserção IS*Ecp1*, IS26 e IS*CR*1, tornando-os mais facilmente recombináveis (Kiiru et al., 2013; Amos et al., 2014).

2.3.3. Carbapenemases

Os carbapenêmicos são utilizados como o último recurso para o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL (Harris et al., 2015). Entretanto, a utilização exacerbada desses antimicrobianos na medicina humana favoreceu a emergência das carbapenemases, que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas na maioria dos casos e, em vários graus, carbapenêmicos e monobactâmicos (Queenan e Bush, 2007).

Dessa forma, as carbapenemases são uma preocupação, pois podem conferir resistência a praticamente todos os β -lactâmicos. Além disso, linhagens produtoras de carbapenemase possuem frequentemente mecanismos de resistência a uma ampla gama de outras classes de agentes antimicrobianos e assim estão associadas a altas taxas de mortalidade (Marchaim et al, 2008; Rodríguez-Baño et al., 2018). A grande maioria das

carbapenemases são enzimas adquiridas, codificadas por genes localizados em elementos transponíveis localizados em plasmídeos (Bonomo, 2017).

Atualmente, *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) está disseminada em vários continentes, causando surtos e endemicidade em certas regiões (Mathers et al., 2015; Tolentino et al., 2018). *K. pneumoniae* produtora de KPC parece ter emergido nos hospitais brasileiros em 2005 (Pavez et al., 2009) e, desde então, tem se tornado endêmica nos ambientes hospitalares do país, sendo associada de forma recorrente a infecções nosocomiais (Peirano et al., 2009; Pereira et al., 2013; Tolentino et al., 2018). Nos dias atuais, a produção de KPC-2 é o mecanismo mais prevalente de resistência adquirida a carbapenêmicos entre as enterobactérias no Brasil, sendo o gene *bla*_{KPC} identificado em diversas espécies (Picão et al., 2013; Andrade et al., 2014; Tolentino et al., 2018). A emergência de isolados co-produtores de KPC-2 e CTX-M tem mostrado ainda que linhagens produtoras de CTX-M têm adquirido *bla*_{KPC-2} com sucesso (Andrade et al., 2014). A disseminação ambiental de clones bacterianos de alto risco produtores de KPC-2 também tem sido reportada no Brasil, principalmente em ambientes aquáticos (Oliveira et al., 2014; Nascimento et al., 2017).

Outras carbapenemases, como as New Delhi metalo- β -lactamases (NDMs), são altamente prevalentes no subcontinente indiano e no Oriente Médio, mas têm sido frequentemente reportadas no Brasil (Carvalho-Assef et al., 2013; Campos et al., 2015; Sanchez et al., 2018). As carbapenemases do tipo imipenemase (IMP) são também encontradas no Brasil e em diferentes partes do mundo (Nordmann et al., 2011; Freire et al. 2016). Além disso, embora bactérias produtoras de carbapenemases do tipo OXA-48-*like* possam ser totalmente sensíveis às cefalosporinas, atualmente podem produzir também, na maioria das vezes, enzimas que hidrolisam esses antimicrobianos, como as ESBL do tipo CTX-M, e serem resistentes a eles (Diab et al., 2017; Machuca et al., 2018). Entre os não fermentadores, a resistência aos carbapenêmicos no Brasil é fortemente associada com as enzimas São Paulo metalo- β -lactamase-1 (SPM-1) para *Pseudomonas aeruginosa* e OXA-23 para o complexo *A. baumannii* (Rossi, 2011, Galetti et al., 2018).

Nesse contexto, polimixinas e tigecilina têm sido consideradas opções em terapias combinadas para o tratamento de bactérias produtoras de carbapenemases (Morrill et al., 2015; Li et al., 2019). Contudo, a emergência nos últimos anos dos genes *mcr* de resistência plasmidial à colistina (polimixina E), tanto em isolados de animais, produtos alimentícios e seres humanos, no Brasil e em muitas outras partes do mundo, tem criado

um cenário alarmante para a saúde pública (Fernandes et al., 2016; Liu et al., 2016; Liu e Liu, 2018; Moreno et al., 2018).

Assim, a disseminação da resistência bacteriana aos antimicrobianos entre diferentes ambientes tem sido abordada como parte de um conceito amplo de saúde única, que reconhece a interconexão entre pessoas, animais, plantas e seus ambientes compartilhados (WHO, 2017). Essa abordagem colaborativa, multissetorial e transdisciplinar, desenvolvendo-se nos níveis local, regional, nacional e global, tem sido proposta para projetar e implementar programas, políticas, legislações e pesquisas em que diversos setores se comunicam e trabalham juntos para alcançar melhores resultados de saúde pública.

2.4. O solo como um reservatório de bactérias multirresistentes

O solo é o ambiente natural de uma variedade de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos, incluindo *Pseudomonas* spp., *A. baumannii, Burkholderia* spp. e *Stenotrophomonas maltophilia* (Walsh e Duffy, 2013; Nesme e Simonet, 2015). A competição entre produtores de antimicrobianos e linhagens resistentes é frequentemente citada para explicar a origem e a diversidade de genes de resistência encontrados nesse ambiente (Nesme e Simonet, 2015). Interessantemente, estudos têm permitido ainda traçar a origem evolutiva e a disseminação de vários genes de resistência adquiridos, os quais teriam sido inicialmente mobilizados do cromossomo para plasmídeos em bactérias do solo. Assim, a origem de genes *bla*_{CTX-M} tem sido relacionada à *Kluyvera ascorbata* (Humeniuk et al., 2002) e *bla*_{NDM-1} a linhagens de *Acinetobacter* (Toleman et al., 2012; Bogaerts et al., 2013).

Bactérias multirresistentes do solo podem também se originar de fontes ambientais (água de irrigação contaminada), animais (adubo orgânico e fezes de animais domésticos ou selvagens) e humanas (esgoto) (Warriner et al., 2009; Han et al., 2016). Estercos, por exemplo, podem possuir naturalmente $10^2 - 10^5$ UFC de *E. coli* e $10^2 - 10^7$ UFC de *Salmonella* spp. por grama (Himathongkham et al., 1999). Nesse sentido, solos agrícolas contendo adubo orgânico têm sido reportados com maior diversidade de bactérias com mais alta resistência a antimicrobianos do que solos não adubados (Popowska et al., 2012). Similarmente, solos irrigados com água de reuso apresentaram aumento significativo da abundância e diversidade de genes de resistência (Han et al., 2016).

De fato, genes codificadores de vários tipos de ESBLs adquiridas, como variantes de *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{GES}, *bla*_{VEB} e *bla*_{PER}, que são frequentemente associados a

isolados clínicos, têm sido encontrados em bactérias isoladas do solo, tais como E. coli, Enterobacter sp., P. aeruginosa, A. baumannii, Serratia sp. e S. maltophilia (Hartmann et al., 2012; Braz et al., 2018; Furlan e Steling, 2018; Furlan e Steling, 2019; Furlan et al., 2018b; Furlan et al., 2018d; Sen e Sarkar, 2018), incluindo isolados de solos agrícolas de diversas cidades e estados brasileiros (Braz et al., 2018; Furlan e Steling, 2018; Furlan e Steling, 2019; Furlan et al., 2018b; Furlan et al., 2018d). E. coli, Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter junii e S. maltophilia produtores de NDM-1 (Wang e Sun, 2015; Zheng et al. 2017; Furlan et al., 2018a) e E. coli carreadora do gene mcr-1 também já foram encontrados (Zheng et al. 2017). Além disso, isolados do solo com numerosos outros genes compondo um amplo resistoma têm sido descritos (Forsberg et al., 2012; Zheng et al. 2017) e o DNA total de amostras de solo tem revelado adicionais genes de resistência associados aos ambientes hospitalares, como bla_{KPC}, bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{OXA-48-} *like*, além de genes de diversas AmpCs, principalmente em solos contaminados (Han et al., 2016; Furlan e Steling, 2017). A grande diversidade bacteriana do solo em uma escala espacial pequena é um fator que ainda favorece a transferência horizontal de genes, contribuindo para a disseminação de determinantes de resistência entre bactérias e a eventual aquisição por patógenos (Forsberg et al., 2012).

Adicionalmente, a presença de metais no solo, os quais podem se originar de fontes como água de irrigação, fertilizantes inorgânicos e pesticidas (Sipter et al., 2008; Kananke et al., 2014), também contribui para a co-seleção de genes de resistência a antimicrobianos. A co-seleção pode ocorrer tanto pela co-resistência (quando a resistência a antimicrobianos e a metais é devida a determinantes genéticos diferentes do genoma), quanto pela resistência cruzada (quando a resistência é devida ao mesmo determinante genético) (Baker-Austin et al., 2006). Outros fatores ambientais, como tipo de solo, nível de umidade, temperatura e fonte de contaminação, influenciam a sobrevivência de patógenos multirresistentes no solo. Estudos têm demonstrado que patógenos sobrevivem por períodos maiores em solos argilosos úmidos, com temperaturas baixas e na presença de adubo orgânico (Guo et al., 2002; Holley et al., 2006; Lang e Smith, 2007; Zhang et al., 2009; Erickson et al., 2010). Dessa maneira, bactérias entéricas podem sobreviver no solo por meses ou anos, favorecendo a contaminação de produtos vegetais utilizados na alimentação (Doyle e Erickson, 2008).

2.5. Papel dos vegetais na disseminação de patógenos, incluindo bactérias multirresistentes

Vegetais frescos são consumidos mundialmente devido à sua reconhecida fonte de nutrientes, vitaminas, fibras e baixo valor calórico, associados à maior preocupação dos consumidores em se manterem saudáveis e com uma dieta balanceada (Pomerleau et al., 2006). Por outro lado, nos últimos anos, diversos patógenos e bactérias multirresistentes de importância clínica têm sido frequentemente reportados em vegetais comerciais, constituindo um problema crescente de segurança alimentar (Hölzel et al., 2018).

Patógenos geralmente associados a surtos de doenças veiculadas por vegetais incluem vírus, como vírus da hepatite A e norovírus, protozoários, como Cyclospora cayetanensis e Cryptosporidium parvum, além de bactérias como Aeromonas hydrophila, Bacillus cereus, Clostridium spp., E. coli, Listeria monocytogenes, Salmonella spp., Shigella spp., Vibrio cholerae, Campylobacter spp. e Yersinia enterocolitica (Beuchat, 2002; Buck et al., 2003; Sivapalasingam et al., 2004; Rangel et al., 2005; Aruscavage et al., 2006; Bayer et al., 2014). Saladas de folhas verdes, alface, brotos de sementes, tomate e frutas são os vegetais frescos mais comumente responsáveis pelos surtos. Várias combinações de patógeno e vegetal ocorrem com maior frequência, como Cyclospora e framboesa, vírus da hepatite A e cebola verde, E. coli e hortaliças, Salmonella e tomate, brotos de sementes e melão (DeWaal e Bhuiya, 2009; Lynch et al., 2009). Especialmente Salmonella e E. coli causam os maiores surtos de doenças associadas ao consumo de produtos vegetais (Buck et al., 2003; Warriner et al., 2009; Bayer et al., 2014). Salmonella enterica, por exemplo, foi responsável por 76%, 60% e 30% dos surtos de intoxicação alimentar causados por frutos, brotos de sementes e hortaliças, respectivamente, nos Estados Unidos durante 1990 a 2004, enquanto E. coli O157:H7 foi responsável por 19%, 40% e 48%, respectivamente, no mesmo período (Brandl, 2006).

Doenças veiculadas por alimentos constituem uma preocupação de saúde pública mundial, principalmente devido ao número de pessoas afetadas e aos custos econômicos. Nos Estados Unidos, surtos associados a produtos hortifrutícolas foram maiores que aqueles envolvendo frutos do mar, ovos e carnes de ave, boi e porco no período de 2005 a 2011 (Olaimat e Holley, 2012). Surtos de *E. coli* O157 têm sido relacionados à alface, rabanete, brotos de alfafa, maçã e outros vegetais (Beuchat, 2002; Marder et al., 2014). O maior surto de *E. coli* O157:H7, um dos sorotipos produtores de toxina shiga mais comumente identificados, ocorreu em 1996 no Japão, envolvendo mais de 12000 casos e 12 mortes, sendo associado ao consumo de brotos de rabanete crus (Michino et al., 1999).

Em 2006, o consumo de espinafre veiculando *E. coli* O157:H7 foi responsável por um sério surto nos Estados Unidos e no Canadá, com 199 casos e três mortes reportados em 26 estados. Em 2011, um grande surto causado por brotos de feno-grego (alforva) contendo *E. coli* O104:H4 ocorreu no norte da Alemanha, resultando em 3911 casos, sendo que 777 pacientes desenvolveram síndrome hemolítica urêmica e 47 morreram (ECDC, 2011). No mesmo ano, um surto pararelo se desenvolveu na região de Bordeaux (França), onde 16 casos foram reportados. Ambos os surtos foram associados a brotos de feno-grego contendo *E. coli* O104:H4 produzidos a partir de sementes importadas do Egito (EFSA, 2011). Recentemente, um surto causado por *E. coli* O157:H7 relacionado ao consumo de alface romana envolveu 210 casos de doença e cinco mortes na América do Norte em 2018 (https://www.cdc.gov/ecoli/2018/o157h7-04-18/index.html).

Similarmente às bactérias do solo, linhagens de relevância clínica em vegetais podem se originar de fontes ambientais, animais e humanas (Beuchat et al., 2002; Cantas et al., 2013). Apesar de dados globais sobre resistência a antimicrobianos variarem de maneira expressiva em bactérias isoladas de vegetais, estudos de monitoramento têm reportado linhagens com fenótipo e genótipo similares aos encontrados em ambientes hospitalares. Em diferentes partes do mundo, enterobactérias, como E. coli, Klebsiella spp., Enterobacter cloacae, Cronobacter sakazaki, produtoras de ESBL, especialmente variantes de CTX-M, SHV e TEM, têm sido isoladas de diversos vegetais, incluindo alface, espinafre, brotos de feijão, brotos de soja, quiabo, pepino, pimenta e berinjela (Reuland et al., 2014; Zurfluh et al., 2015a; Lopes et al., 2017a). E. coli e Klebsiella spp. produtoras de KPC-2, NDM-1, OXA-48 e OXA-181 em alface, tomate, coentro e salsa (Zurfluh et al., 2015b; Touati et al., 2017; Wang et al., 2018), E. coli carreadora de mcr-1 em alface (Jones-Dias et al., 2016), além de Pseudomonas spp. resistentes a carbapenêmicos e colistina, Enterococcus spp. resistentes à vancomicina, Enterococcus spp. e Staphylococcus aureus resistentes à linezolida em vegetais bulbosos, raízes, saladas prontas e cereais também já foram reportados (Schwaiger et al., 2011; Hong et al., 2015; Kim et al., 2017). Adicionalmente, um amplo conjunto de outros genes de resistência a diversas classes de antimicrobianos, consistente com resultados descritos para isolados clínicos, tem sido encontrado em isolados de vegetais (Lopes et al., 2017a; Wang et al., 2017), sendo, em alguns casos, o contexto genético dos principais genes de resistência idêntico ao de bactérias isoladas de humanos e animais (Wang et al., 2017).

Dessa forma, a crescente demanda por vegetais frescos em conjunto com práticas agrícolas por vezes inapropriadas e o fato de vegetais receberem um processamento

mínimo e serem frequentemente consumidos crus podem contribuir para a disseminação de diversos patógenos, incluindo bactérias carreadoras de genes de resistência clinicamente importantes para humanos e animais.

2.6. Bactérias endofíticas

Bactérias endofíticas são conhecidas há mais de 120 anos (Hardoim et al., 2008) e correspondem a bactérias, cultiváveis ou não, que colonizam o interior de plantas sem causar danos aparentes a esses hospedeiros (Hallmann et al., 1997). Existem diversas portas de entrada para bactérias endofiticas em plantas, principalmente os estômatos e as lesões que ocorrem naturalmente como resultado do crescimento da planta, além dos tricomas radiculares e das junções epidermais (Hardoim et al., 2015; Lopes et al., 2015) (Figura 4). Algumas bactérias também possuem penetração ativa em tecidos do hospedeiro, produzindo enzimas celulolíticas e pectinolíticas (Kandel et al., 2017).



Figura 4. Entrada e colonização de bactérias em plantas. Imagens de microscopia eletrônica de diferentes bactérias associadas à planta, (A) *Bacillus subtilis* e (B) *Pseudomonas fluorescens*. (C) e (D) Bactérias formando biofilmes em raízes. (E) *Methylobacterium* spp. localizada em estômato e (F) *Burkholderia phytofirmans* endofítica (em verde) localizada dentro da planta (Modificado de Lakshmanan et al., 2014).
Uma vez dentro do tecido vegetal, elas podem permanecer em um local específico, como o córtex da raiz, ou colonizar a planta de forma sistêmica através dos elementos condutores ou do apoplasto. A capacidade de dispersão sistêmica foi demonstrada para endofiticos como *Erwinia* sp. em algodão (Misaghi e Donndelinger, 1990), *Pseudomonas aureofaciens* em milho (Lamb et al., 1996) e *Bacillus thuringiensis* em leguminosas (Tanuja et al., 2013). Geralmente, bactérias endofíticas colonizam o espaço intercelular (Kandel et al., 2017), sendo poucos os relatos demonstrando a colonização intracelular (Thomas e Sekhar et al., 2014; Pinsk et al., 2019). A colonização do sistema vascular também foi reportada (Compant et al., 2008; Rangjaroen et al., 2017).

Além disso, os padrões de colonização de bactérias endofíticas em tecidos de plantas são fortemente dependentes de fatores bióticos e abióticos que interagem entre si (Hardoim et al., 2015). Um dos fatores bióticos mais importantes é a presença de outros micro-organismos associados ao vegetal, como fungos, vírus e outras bactérias (Halmann et al., 1998; Mantzoukas e Lagogiannis, 2019). Como o espaço e os nutrientes fornecidos pelo hospedeiro são fatores limitantes, existem vários tipos de interação entre os microorganismos que possuem o mesmo micro-hábitat, incluindo antagonismo, simbiose e mutualismo. Os tecidos internos das plantas fornecem um ambiente mais uniforme e protetor para os micro-organismos do que a superfície vegetal, onde exposições a condições ambientais extremas, como temperatura, concentração osmótica e radiação ultravioleta, são fatores limitantes para a sobrevivência (Hallmann et al., 1997; Kandel et al., 2017). Um exemplo típico da influência de fatores abióticos na população de bactérias endofíticas é o que ocorre em sítios contaminados com metais pesados, petróleo, solventes, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos ou outros contaminantes orgânicos, onde vegetais crescendo nesses solos são capazes de recrutar bactérias capazes de degradar os poluentes (Ashraf et al., 2018). As características do solo, como pH, salinidade e textura também influenciam a composição de bactérias endofíticas, visto que alteram a comunidade bacteriana da rizosfera, a principal fonte de bactérias endofíticas potenciais (Doty, 2008; Ryan et al., 2008).

Em relação à estratégia de vida, as bactérias endofíticas podem ser classificadas como obrigatórias ou facultativas. As bactérias endofíticas obrigatórias são estritamente dependentes da planta hospedeira para o seu crescimento e sobrevivência. A transmissão dessas bactérias ocorre verticalmente ou por meio da veiculação de um vetor. Já os microorganismos endofíticos facultativos se caracterizam por alternar entre o interior dos tecidos vegetais e o ambiente. A diversidade microbiana endofítica encontrada nas plantas pode ser explicada principalmente pela capacidade de diversos endofíticos facultativos entrarem e persistirem no interior da planta (Rosenblueth e Martinez-Romero, 2006; Kandel et al., 2017).

Além disso, as bactérias endofíticas propiciam muitas vantagens para os vegetais, incluindo promoção do crescimento (Barka et al., 2002; Tanuja et al., 2013; Etminani et al., 2018), indução dos mecanismos de defesa sistêmicos (Mishra et al., 2006; Bakker et al., 2007; Lopes et al., 2018), redução de sintomas de doenças causadas por patógenos (Coombs et al., 2004; Klopper et al., 2004; Pinsk et al., 2019), controle de insetos e nematoides (D'alessandro et al., 2014), produção de compostos anti-herbivoria (Scott, 2001; Sullivan et al., 2007), fixação biológica de nitrogênio (Martínez et al., 2003; Jha e Kumar, 2007; Etminani et al., 2018) e o aumento da tolerância aos estresses ambientais (Andreolli et al., 2013; Syranidou et al., 2018). A figura 5 apresenta alguns dos principais tipos de interações entre bactérias endofíticas e plantas, envolvendo a síntese de metabólitos com diferentes papéis. Embora as interações existentes entre bactérias endofíticas e plantas têm sido estudadas intensamente, os perfis fenotípicos e genotípico



Figura 5. Representação esquemática de diferentes tipos de interações entre bactérias endofíticas e plantas, levando à síntese de metabólitos que, em diversos casos, não são produzidos pelo macro ou pelo micro-simbionte sozinho ou são produzidos em quantidades diferentes. Recentes avanços têm sido feitos com relação à produção de metabólitos por bactérias endofíticas, revelando que elas possuem capacidade de produzir uma variedade cada vez mais surpreendente dessas substâncias. Os metabólitos produzidos por bactérias endofíticas podem exibir importantes funções, incluindo papel na defesa e competição da planta e do micro-organismo, além de contribuírem também para a obtenção de nutrientes e interação específica (Brader et al., 2014).

clinicamente significativos de resistência a antimicrobianos nessas bactérias ainda foram pouco investigados, não se sabendo o quão comum eles são, a sua contribuição para o *fitness* bacteriano e a frequência da transferência horizontal de genes de resistência no microbioma vegetal.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar e caracterizar molecularmente e fenotipicamente bactérias endofíticas gram-negativas multirresistentes de importância clínica isoladas de hortaliças comerciais de diferentes origens.

3.2. Objetivos específicos

i) Isolar bactérias endofíticas gram-negativas multirresistentes a antimicrobianos e clinicamente significantes;

ii) Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos;

iii) Analisar os determinantes de resistência e de virulência, bem como os tipos clonais dos isolados;

iv) Analisar os plasmídeos carreadores de genes de resistência e sua capacidade de transferência horizontal;

v) Caracterizar o contexto genético dos principais genes de resistência a antimicrobianos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta das amostras vegetais

Entre setembro de 2015 e fevereiro de 2016 e setembro e novembro de 2018, amostras de hortaliças foram coletadas de uma empresa estatal brasileira de fornecimento de alimentos de São Paulo, Brasil (n=48), e de três mercados do distrito de Aveiro, Portugal (n=36). Os vegetais incluíram alface (n=13), escarola (n=13), espinafre (n=12), agrião (n=11), rúcula (n=9), beterraba (n=4), couve (n=4), rabanete (n=4), repolho (n=4), canônigo (n=4), almeirão (n=2), aipo (n=2) e alho-poró (n=2). Após a coleta, as amostras foram transportadas em sacos plásticos fechados até ao Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) ou ao Laboratório de Microbiologia (MicroLab) da Universidade de Aveiro, estocadas a 4 °C e o isolamento de bactérias endofíticas das folhas das amostras foi realizado dentro de 24 h.

4.2. Isolamento de bactérias endofíticas

As folhas das amostras coletadas foram lavadas em água corrente e a desinfecção da superfície bem como o isolamento de bactérias endofíticas foram realizados de acordo com Araújo et al. (2001). Para a desinfecção superficial, aproximadamente 4 g de folha foram imersos sequencialmente em etanol 70% por 1 min., hipoclorito de sódio (2,5% de Cl⁻ ativo) por 4 min., etanol 70% por 30 s. e lavados três vezes em água destilada estéril. Alíquotas da água estéril usada na lavagem final foram plaqueadas em ágar nutriente e as placas incubadas a 30 °C para confirmar a eficácia do processo de desinfecção. Para o isolamento de bactérias endofíticas, as amostras desinfectadas foram maceradas em 12 ml de solução salina estéril (NaCl 0,85%), sendo o macerado inoculado em caldo Luria-Bertani (LB) suplementado com 2 μ g/ml de ceftriaxona ou 2 μ g/ml de cefotaxima por 24 h a 30 °C. Em seguida, alíquotas do extrato foram plaqueadas em triplicata em ágar MacConkey (*DifcoTM*) suplementado com os mesmos antimicrobianos e as placas foram então incubadas por 18 h a 37 °C. Colônias de diferentes morfologias foram selecionadas e purificadas por esgotamento por estrias.

4.3. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos

4.3.1. Teste de disco-difusão em ágar

O perfil de suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos foi analisado primeiramente pelo teste de disco-difusão em ágar (Bauer et al., 1966). Os antimicrobianos utilizados incluiram amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg), ceftriaxona (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), ceftiofur (30 µg), cefepima (30 µg), cefoxitina (30 µg), aztreonam (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), perfloxacina (5 μ g), norfloxacina (10 μ g), enrofloxacina (5 μ g), levofloxacina (5 μ g), moxifloxacina (5 μg), ertapenem (10 μg), meropenem (10 μg), imipenem (10 μg), canamicina (30 μg), estreptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (5 µg), tobramicina (10 µg), amicacina (30 μ g), netilmicina (30 μ g), tetraciclina (30 μ g), doxiciclina (30 μ g), tigeciclina (15 μ g), sulfonamidas (300 μ g), trimetoprima (5 μ g), trimetoprima/sulfametoxazol (1,25/23,75 µg), cloranfenicol (30 µg) e fosfomicina (200 µg). E. coli ATCC 25922 foi utilizada como controle e os resultados interpretados de acordo com os critérios do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI), para bactérias isoladas de humanos (CLSI, 2019) e de animais (CLSI, 2018), e do Comitê Europeu de Avaliação de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST, 2019) (http://www.eucast.org/clinical_ <u>breakpoints/</u>).

4.3.2. Detecção fenotípica de ESBL

A detecção de ESBL foi realizada inicialmente pelo teste sinérgico do duplo disco, em que discos contendo ceftriaxona (30 µg), ceftazidima (30 µg), ceftiofur (30 µg) e aztreonam (30 µg) foram posicionados a uma distância de 20 mm (centro a centro) de um disco contendo amoxicilina/ácido clavulânico (20/10µg) em placa inoculada com o isolado avaliado, conforme o procedimento de disco-difusão padrão. A distorção do halo de inibição dos antimicrobianos em direção ao disco de amoxicilina/ácido clavulânico foi considerada resultado positivo para a produção de ESBL (Thomson e Sanders, 1992; Jarlier et al., 1988). Fitas *Etest*[®] ESBL contendo ceftazidima sozinha e em combinação com ácido clavulânico (*bioMérieux*, Marcy-l'Étoile, França) foram utilizadas para confirmar os resultados, de acordo com as instruções do fabricante. O resultado foi considerado positivo quando a razão da CIM da ceftazidima sozinha e da associação ceftazidima/ácido clavulânico foi ≥ 8 (Cormican et al., 1996). A espécie dos isolados produtores de ESBL foi identificada por VITEK[®] 2 (*bioMérieux*, Marcy-l'Étoile, França).

4.3.3. Concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos para os isolados produtores de ESBL foi determinada utilizando fitas *Etest[®]* (*bioMérieux*, Marcy-l'Étoile, França) e os resultados interpretados de acordo com o CLSI (CLSI, 2018; CLSI, 2019) ou EUCAST (2019).

4.4. Detecção de genes bla_{CTX-M}

Os isolados produtores de ESBL foram cultivados em caldo LB por 16 h a 37 °C e o DNA total foi extraído pelo método de fervura (Chapman et al., 2001). Os seguintes pares de iniciadores foram utilizados para a detecção de genes bla_{CTX-M} por PCR: CTX-M (CTX-MA [5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3'] e CTX-MB [5'-ACCGCGATATCGTTGT-G-3']; ou CTX-F [5'-SCVATGTGCAGYACCAGTAA-3'] e CTX-R [5'-GCTGCCGGTY-TTATCVCC-3']) (Bonnet et al., 2001; Lu et al., 2010); e CTX-M-15 (CTX-M-15-SF [5'-CACACGTGGAATTTAGGGACT-3'] e CTX-M-15-SR [5'-GCCGTCTAAGGCGATAA-ACA-3']) (Muzaheed et al., 2008). As amplificações foram realizadas com um volume final de 25 µl, contendo 50 ng de DNA total, 0,1 µM de iniciador (cada), 2,5 mM de MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, USA), 250 µM de dNTP (cada) (Thermo Fisher Scientific, USA); tampão de reação 1X (Thermo Fisher Scientific, USA) e 1,25 U de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, USA). As condições de reação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min., seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min., anelamento a 49 °C (CTX-MA e CTX-MB), 55 °C (CTX_F e CTX_R) ou 56 °C (CTX-M-15-SF e CTX-M-15-SR) por 1 min. e extensão a 72 °C por 1 min., com extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 1,0% (p/v) corado com $GelRed^{TM}$ (Biotium, Hayward, EUA) e visualizados com o sistema de fotodocumentação L-Pix Chemi (Loccus biotecnologiaTM, Cotia, Brasil).

4.5. Dinâmica do estilo de vida endofítico de enterobactérias produtoras de ESBL

A análise e confirmação da capacidade de estilo de vida endofítico dos isolados produtores de ESBL foi realizada utilizando o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) como modelo para o estudo, de acordo com protocolo previamente descrito (Tanuja et al., 2013) com modificações. Inicialmente, grãos de feijão tiveram a superfície desinfetada como descrito no item 4.2 e, em seguida, foram incubados a 30 °C em placas de Petri contendo algodão estéril umedecido até o início do crescimento da radícula (dois a três dias). Após a

germinação, os brotos foram imersos por 30 min. na suspensão celular (DO₆₀₀ = 1,5) do isolado analisado e transferidos para frascos contendo meio Murashige e Skoog (MS) modificado (CaCl₂.2H₂O 2,0 mM, MgSO₄.7H₂O 0,5 mM, KCl 2,0 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, FeSO₄.7H₂O 0,065 mM, H₃BO₃ 2,3 mM, MnSO₄.H₂O 0,9 mM, ZnSO₄.H₂O 0,6 mM, Na₂MoO₄.H₂O 0,1 mM, CoCl₂.6H₂O 0,01 mM, CuSO₄.5H₂O 0,15 mM, glicina 2 mg/l, mio-inositol 100 mg/l, piridoxina.HCl 0,5 mg/l e ágar 8,0 g/l, pH6,5). Os frascos foram então incubados a 30 °C por 15 dias e, após esse período, foi realizado o isolamento das bactérias endofíticas da raiz e da parte aérea das plantas, como descrito no item 4.2. Em seguida, os isolados obtidos foram avaliados quanto à presença de genes *bla*_{CTX-M} e comparados aos inoculados inicialmente por ERIC-PCR. Os ensaios foram realizados em triplicata (com três plantas em cada replicata). *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 e água destilada estéril foram utilizados como controles negativos nos ensaios. Para A. *baumannii* ATCC 19606, a seleção foi realizada em MacConkey suplementado com 128 µg/ml de cefoxitina.

4.6. *Fingerprinting* genômico por PCR de sequências consenso repetitivas intergênicas de enterobactérias (ERIC-PCR) e de elementos BOX (BOX-PCR)

A clonalidade dos isolados da mesma espécie foi analisada primeiramente por meio do perfil genotípico obtido pela amplificação de sequências consenso repetitivas intergênicas de enterobactérias (ERIC-PCR) e de elementos BOX (BOX-PC). Para o ERIC-PCR foi utilizado o iniciador ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (Versalovic et al., 1991). As amplificações foram realizadas com um volume final de 25 µl, contendo 100 ng de DNA total, 2 µM do iniciador, 3,0 mM de MgCl₂ (*Thermo Fisher* Scientific, USA), 250 µM de dNTP (cada) (Thermo Fisher Scientific, USA), tampão de reação 1X (Thermo Fisher Scientific, USA) e 1,25 U de Tag DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, USA). As condições de reação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min., seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min., anelamento a 52 °C por 1 min. e extensão a 72 °C por 8 min., com extensão final a 72 °C por 16 min. Para o BOX-PCR, foi utilizado o iniciador BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTG-AC-3') (Versalovic et al., 1994). As amplificações foram realizadas com um volume final de 25 µl, contendo 100 ng de DNA total, 2 µM do iniciador e 6,25 µl de NZYTaq $2\times$ Green Master Mix (2,5 mM de MgCl2, 200 µM de dNTPs e 0,2 U/µl de DNA polimerase) (NZYtech, Portugal). As condições de reação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 7 min., seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min., anelamento a 53 °C por 1 min. e extensão a 65 °C por 8 min., com extensão final a 65 °C por 16 min. Em seguida, os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 1,5% (p/v) a 70 V por 2,5 h.

4.7. Determinação de filogrupos de E. coli

Em virtude da relação existente entre grupo filogenético de *E. coli* e virulência, o método baseado em PCR descrito por Clermont et al. (2013) foi utilizado para determinar o filogrupo (A, B1, B2, C, D, E, F de *E. coli sensu stricto* ou clado I crítico de *Escherichia*) dos isolados de *E. coli* multirresistentes.

4.8. Transferência horizontal de plasmídeos de resistência

4.8.1. Conjugação

Nos ensaios de conjugação, *E. coli* C600 resistente à estreptomicina, *E. coli* J53 resistente à azida sódica ou *E. coli* CV601 resistente à rifampicina foi utilizada como linhagem receptora. As linhagens doadoras e receptoras foram crescidas em caldo LB por 18 h a 37°C e 180 rpm. Em seguida, um inóculo das culturas ($DO_{600}=0,05$) foi crescido em caldo LB fresco até atingir a $DO_{600}=0,6-0,8$ e as linhagens foram misturadas na proporção 1:3:1 (doadora:receptora:meio). A mistura foi então incubada por 18 h a 37°C sem agitação e plaqueada em ágar McConkey suplementado com 2 µg/ml de ceftriaxona ou 2 µg/ml de ceftriaxona e 2000 µg/ml de estreptomicina ou 200 µg/ml de azida ou 100 µg/ml de rifampicina para a seleção dos transconjugantes. Os transconjugantes foram confirmados por PCR para *bla*_{CTX-M} e pelo perfil de suscetibilidade a antimicrobianos.

4.8.2. Transformação de E. coli TOP10 por choque térmico

Os plasmídeos dos isolados foram extraídos pelo método de lise alcalina descrito por Birnboim e Doly (1979). O preparo de *E. coli* TOP10 ultra-competente e a transformação foram realizados de acordo com Inoue et al. (1990), aumentando-se o tempo de choque térmico a 42 °C para 1,5 min.

4.9. Construção das bibliotecas e sequenciamento genômico

Para a construção das bibliotecas e sequenciamento genômico, os isolados endofíticos produtores de ESBL foram crescidos em caldo LB por 18 h a 37 °C e o DNA total foi extraído utilizando o *PureLink[®] Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific*, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação e a qualidade

do DNA foram determinadas com o fluorômetro *Quibit*[®], utilizando o *dsDNA HS* (*High Sensitivity*) *Assay Kit*. No próximo passo, a construção das bibliotecas genômicas e o sequenciamento foram realizados no Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, no Centro de Facilidades de apoio à Pesquisa (CEFAP) – ICB/USP ou enviados à *Eurofins Genomics* (Constança, Alemanha). O preparo das bibliotecas do tipo *paired-end* foi feito utilizando o *Nextera XT DNA Library Prep Kit* (Illumina Inc.), de acordo com protocolo do fabricante. Após o preparo das bibliotecas, o tamanho dos fragmentos foi avaliado pelo método de eletroforese capilar utilizando o sistema *Agilent Bioanalyzer DNA 1000* e a quantificação final foi aferida com *Quibit*[®]. Em seguida, o sequenciamento genômico foi realizado com a plataforma MiSeq (300 pb *paired-end*) (Illumina Inc.) ou HiSeq 4000 (150 pb *paired-end*) (Illumina Inc.).

4.10. Montagem e anotação de genomas

As *reads* de alta qualidade obtidas (Q≥20) foram montadas *de novo* em *contigs* utilizando *SPAdes* v. 3.9.0 (Bankevich et al., 2012) ou *Velvet* v. 1.2.10 (Zerbino e Birney, 2008). A anotação automática foi realizada com *Prokka* (Seemann, 2014) e *NCBI Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline* (PGAP) (Angiuoli et al., 2008). A curadoria manual das anotações foi realizada com *Geneious* v. R10 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand).

4.11. Análise do resistoma, viruloma, tipagem, elementos genéticos móveis e genes que favorecem a associação com plantas

O resistoma e os genes de virulência dos isolados foram analisados utilizando ResFinder v. 3.1 (Zankari et al., 2012) e VirulenceFinder v. 2.0 (Joensen et al., 2014), respectivamente. A sequência tipo (ST) foi identificada com MLST v. 2.0 (Larsen et al., 2012), enquanto o sorotipo foi determinado usando SerotypeFinder v. 2.0 (Joensen et al., 2015) e os bancos de dados para genotipagem do Instituto Pasteur (http://bigsdb.pasteur.fr/). A identificação dos grupos de incompatibilidade plasmidiais foi realizada com PlasmidFinder v. 2.0 (Carattoli et al., 2014) e os elementos transponíveis analisados com ISFinder (Siguier et al., 2006), utilizando os parâmetros padrão. Para a identificação de genes que favorecem a associação bacteriana com plantas, as reads foram alinhadas contra um banco de dados in-house contendo genes descritos na literatura e obtidos do GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/), seguida de análise usando o programa blastX (identidade >90%; e-value <10⁻⁵).

4.12. Análise estatística

Os dados de densidades de bactérias endofíticas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a P < 0,05 usando *IBM SPSS Statistics 24* (IBM, Estados Unidos).

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento bacteriano

Durante este estudo de monitoramento realizado para avaliar a ocorrência de bactérias endofíticas multirresistentes produtoras de ESBL em hortaliças comerciais, as amostras analisadas foram provenientes de diferentes cidades do estado de São Paulo (Brasil) e do distrito de Aveiro (Portugal). Em geral, os resultados mostraram uma diferença significativa no número de bactérias endofíticas não suscetíveis à ceftriaxona ou à cefotaxima de acordo com o vegetal avaliado e o local de origem da amostra (teste de Duncan, P<0,05) (Tabela 2).

Vegetal	$UFC/g \pm DP$	País	Cidade	Coordenadas geográficas
Repolho	$4,33\pm0,28 \times 10^{3} \Delta$	Brasil	Piedade	23°25'12"S, 47°15'00"W
Almeirão	$3,74\pm0,21x10^{3}$ †	Brasil	Piedade	23°25'12"S, 47°15'00"W
Alface	$2,95\pm0,16x10^{3}$ ‡	Brasil	Arujá	23°13'48"S, 46°11'24"W
Escarola	2,70±0,15x10 ³ ‡#	Portugal	Aveiro	40°38'39" N, 8°38'43"W
Alface	2,48±0,15x10 ³ #	Portugal	Aveiro	40°38'39" N, 8°38'43"W
Espinafre	8,94±0,99x10 ² *	Brasil	Ibiúna	23°23'24"S, 47°07'48"W
Repolho	$7,02\pm0,42x10^2$ §	Portugal	Aveiro	40°38'39" N, 8°38'43"W
Rúcula	$5,59\pm0,9x10^{2}$ for ϕ	Brasil	Vargem Grande Paulista	23°21'00"S, 47°00'36"W
Agrião	5,20±0,56x10 ² ф	Portugal	Aveiro	40°38'39" N, 8°38'43"W
Couve	$4,99\pm0,71x10^{2}\varphi$	Brasil	Ibiúna	23°23'24"S, 47°07'48"W
Beterraba	$3,95\pm0,42x10^2$ ¶	Brasil	Vargem Grande Paulista	23°21'00"S, 47°00'36"W
Espinafre	3,12±0,27x10 ² Ж	Brasil	Vargem Grande Paulista	23°21'00"S, 47°00'36"W
Rabanete	2,84±0,29x10 ² Ж	Brasil	Ibiúna	23°23'24"S, 47°07'48"W
Almeirão	1,97±0,52x10 ² g	Brasil	Mogi das Cruzes	23°18'36"S, 46°06'36"W

Tabela 2. Densidades mais altas de bactérias endofíticas gram-negativas não suscetíveis à ceftriaxona ou à cefotaxima

Médias \pm desvio padrão (DP) seguidas pelo mesmo símbolo na mesma coluna não diferem pelo teste de Duncan (P < 0.05).

As amostras de repolho e almeirão provenientes de Piedade $(23^{\circ}25'12"S, 47^{\circ}15'00"W)$ apresentaram as maiores densidades de bactérias não suscetíveis à ceftriaxona ou à cefotaxima $(4,33x10^3 \text{ UFC/g e } 3,74x10^3 \text{ UFC/g}, \text{ respectivamente})$. Além disso, as amostras de repolho de Piedade e alface de Arujá $(23^{\circ}13'48"S, 46^{\circ}11'24"W)$ possuíram maiores densidades bacterianas $(4,33x10^3 \text{ UFC/g} \text{ e } 2,95x10^3 \text{ UFC/g}, \text{ respectivamente})$ que vegetais do mesmo tipo de Aveiro $(40^{\circ}38'39" \text{ N}, 8^{\circ}38'43"W)$ $(7,02x10^2 \text{ UFC/g} \text{ e } 2,48x10^3 \text{ UFC/g}, \text{ respectivamente})$. Da mesma forma, as amostras de

almeirão de Piedade e espinafre de Ibiúna $(23^{\circ}23'24"S, 47^{\circ}07'48"W)$ apresentaram maiores densidades de bactérias $(3,74x10^{3} \text{ UFC/g} \text{ e } 8,94x10^{2} \text{ UFC/g}, \text{ respectivamente})$ que vegetais do mesmo tipo de Mogi das Cruzes $(23^{\circ}18'36"S, 46^{\circ}06'36"W)$ e de Vargem Grande Paulista $(23^{\circ}21'00"S, 47^{\circ}00'36"W)$ $(1,97x10^{2} \text{ UFC/g} \text{ e } 3,12x10^{2} \text{ UFC/g}, \text{ respectivamente})$. Em outros casos, não houve diferença significativa entre diferentes amostras, tais como rúcula de Vargem Grande Paulista $(5,59x10^{2} \text{ UFC/g})$, couve de Ibiúna $(4,99x10^{2} \text{ UFC/g})$ e agrião de Aveiro $(5,20x10^{2} \text{ UFC/g})$. Diversos vegetais amostrados ainda não apresentaram bactérias endofíticas isoladas em meio suplementado com ceftriaxona ou cefotaxima (dados não mostrados).

5.2. Padrões de suscetibilidade antimicrobiana de bactérias endofíticas

Na triagem inicial dos isolados, a resistência antimicrobiana foi detectada para a maioria dos antimicrobianos testados, exceto para meropenem e imipenem (Tabela 3). Cento e setenta e oito isolados (84,8% do total de isolados avaliados) foram resistentes a um ou mais antimicrobianos. Para a maioria dos antimicrobianos testados, as taxas de resistência foram maiores nos isolados do Brasil. Além da resistência à ceftriaxona ou à cefotaxima (84,8% do total de isolados; 83,3% e 86,7% dos isolados de amostras do Brasil e de Portugal, respectivamente), a resistência à amoxicilina/ácido clavulânico foi relativamente alta em isolados de amostras dos dois países (29,0% no total; 32,5% e 24,4% dos isolados do Brasil e de Portugal, respectivamente). A resistência à tetraciclina também foi relativamente elevada para isolados de ambos os países (16,2% no total; 20,0% e 11,1% dos isolados do Brasil e de Portugal, respectivamente), seguida por resistência à ceftazidima (15,7% no total; 14,2% e 17,8% dos isolados do Brasil e de Portugal, respectivamente) e à aztreonam (13,3% no total; 16,7% e 8,9% dos isolados do Brasil e de Portugal, respectivamente). Por outro lado, as taxas de resistência mais baixas foram para, em adição aos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem), amicacina (0,5% no total; 0,8% e 0% dos isolados do Brasil e de Portugal, respectivamente), cloranfenicol (5,2% no total; 5% e 5,6% dos isolados do Brasil e de Portugal, respectivamente) e (fluoro)quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina e enrofloxacina) (5,7% no total; 7,5% e 3,3% dos isolados do Brasil e de Portugal, respectivamente) (Tabela 3).

	Número de isolados resistentes (%)						
Antimicrobiano	Brasil	Portugal					
Amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg)	39 (32,5)	22 (24,4)					
Ceftriaxona (30 µg)	100 (83,3)	-					
Cefotaxima (30 µg)	-	78 (86,7)					
Ceftazidima (30 µg)	17 (14,2)	16 (17,8)					
Ceftiofur (30 µg)	12 (10,0)	-					
Cefepima (30 µg)	6 (5,0)	10 (11,1)					
Cefoxitina (30 µg)	15 (12,5)	-					
Aztreonam (30 μg)	20 (16,7)	8 (8,9)					
Ácido nalidíxico (30 μg)	5 (4,2)	2 (2,2)					
Ciprofloxacina (5 µg)	2 (1,7)	1 (1,1)					
Enrofloxacina (5 µg)	2 (1,7)	-					
Imipenem (10 µg)	0 (0,0)	0 (0,0)					
Meropenem (10 µg)	0 (0,0)	0 (0,0)					
Ertapenem (10 µg)	1 (0,8)	0 (0,0)					
Gentamicina (10 µg)	17 (14,2)	8 (8,9)					
Amicacina (30 µg)	1 (0,8)	0 (0,0)					
Tetraciclina (30 µg)	24 (20,0)	10 (11,1)					
Doxiciclina (30 µg)	9 (7,5)	7 (7,8)					
Sulfametoxazol/trimetoprima (23,75/1,25 μ g)	15 (12,5)	8 (8,9)					
Cloranfenicol (30 µg)	6 (5,0)	5 (5,6)					

Tabela 3. Porcentagem de resistência de isolados endofíticos do Brasil (n=120) e de Portugal (n=90) aos principais antimicrobianos avaliada pelo teste de disco-difusão em ágar.

5.3. Bactérias endofíticas multirresistentes produtoras de ESBL

Após a avaliação inicial do perfil de resistência antimicrobiana dos isolados, nove enterobactérias endofíticas produtoras de ESBL foram confirmadas. Desse total, seis isolados foram obtidos a partir de duas amostras de espinafre, uma de repolho, uma de alface e uma de rúcula do Brasil (10,4% das amostras brasileiras) e duas amostras de alface e uma de agrião de Portugal (8,3% das amostras portuguesas) (Tabela 4 e Figura 6).

Os isolados produtores de ESBL foram identificados como *Escherichia coli* (ALF012, ALF043, AGR028, ESP110, REP215 e REP237), *Klebsiella pneumoniae* (ALF301 e RUC232) e *Enterobacter cloacae* (ESP151), os quais exibiram perfil de multirresistência com altas CIMs principalmente para penicilinas, cefalosporinas e aztreonam. A resistência às (fluoro)quinolonas foi também detectada em *K. pneumoniae* RUC232 e em duas *E. coli* (ALF012 e REP215) (Tabelas 5 e 6). No entanto, todos os

Espécie	Linhagem	Vegetal	País	Coordenadas geográficas	Perfil de resistência	Fenótipo ESBL	CIM Caz/Czl
E. cloacae	ESP151	Espinafre	Brasil	23°23'24" S, 47°07'48" W	Amc, Cro, Ctf, Cfo, Atm, Gen, Tob, Str, Sxt, Chl	+	8/0,25
K. pneumoniae	ALF301	Alface	Brasil	23°13'48" S, 46°11'24" W	Cro, Ctf, Cpm, Atm, Gen, Tob, Str, Sxt, Chl, Tet	+	8/0,5
K. pneumoniae	RUC232	Rúcula	Brasil	23°21'00" S, 47°00'36" W	Amc, Cro, Caz, Atm, Str, Nal, Cip, Eno, Tet	+	16/1
E. coli	ALF012	Alface	Portugal	40°38'39" N, 8°38'43"W	Amc, Ctx, Caz, Cpm, Atm, Str, Nal, Cip, Sul, Sxt, Tet, Dox	+	-
E. coli	ALF043	Alface	Portugal	40°38'39" N, 8°38'43"W	Amc, Ctx, Caz, Cpm, Atm, Sul, Sxt, Tet, Dox	+	-
E. coli	AGR028	Agrião	Portugal	40°38'39" N, 8°38'43"W	Amc, Ctx, Caz, Cpm, Atm	+	-
E. coli	ESP110	Espinafre	Brasil	23°23'24" S, 47°07'48" W	Amc, Cro, Caz, Atm, Kan, Gen, Tob, Sxt, Chl, Tet	+	16/1
E. coli	REP215	Repolho	Brasil	23°25'12" S, 47°15'00" W	Cro, Ctf, Cpm, Atm, Gen, Nal, Cip, Eno, Nor, Pef, Lvx, Mfx, Sxt	+	8/0,5
E. coli	REP237	Repolho	Brasil	23°25'12" S, 47°15'00" W	Amc, Cro, Ctf, Cpm, Atm, Sxt, Tet, Dox	+	24/0,5
E. coli	TF-ESP151	NA	NA	NA	Amc, Cro, Ctf, Atm	+	4/0,19
E. coli	TF-ALF301	NA	NA	NA	Cro, Ctf, Cpm, Atm	+	4/0,125
E. coli	TF-RUC232	NA	NA	NA	Amc, Cro, Caz, Atm	+	8/0,25
E. coli	TC-ALF043	NA	NA	NA	Amc, Ctx, Caz, Ctf, Atm	+	-
E. coli	TC-AGR028	NA	NA	NA	Ctx, Caz, Cpm, Atm	+	-
E. coli	TC-ESP110	NA	NA	NA	Amc, Cro, Atm, Kan	+	8/0,5
E. coli	TC-REP215	NA	NA	NA	Cro, Ctf, Atm	+	8/0,25
E. coli	TC-REP237	NA	NA	NA	Amc, Cro, Ctf, Cpm, Atm	+	12/0,5
E. coli	TOP10	NA	NA	NA	-	-	-
E. coli	J53	NA	NA	NA	Azi	-	-
E. coli	C600	NA	NA	NA	Str	-	-
E. coli	CV601	NA	NA	NA	Kan, Rif	-	-

Tabela 4. Perfil fenotípico de resistência antimicrobiana de linhagens de *Enterobacteriaceae* endofíticas produtoras de ESBL, transformantes, transconjugantes e receptoras.

Amc, amoxicilina/ácido clavulânico; Cro, ceftriaxona; Ctx, cefotaxima; Caz, ceftazidima; Czl, ceftazidima/ácido clavulânico; Ctf, ceftiofur; Cpm, cefepima; Cfo, cefoxitina; Atm, aztreonam; Kan, canamicina; Gen, gentamicina; Tob, tobramicina; Str, estreptomicina; Nal, ácido nalidíxico; Cip, ciprofloxacina; Eno, enrofloxacina; Nor, norfloxacina; Pef, pefloxacina; Lvx, levofloxacina; Mxf, moxifloxacina; Sul, sulfonamidas; Sxt, sulfametoxazol/trimetoprima; Chl, cloranfenicol; Tet, tetraciclina; Dox, doxiciclina; Azi, azida; Rif, rifampicina. TF, transformante; TC, transconjugante; NA, não aplicável.



Figura 6. (a) Antibiograma mostrando o perfil de resistência de *E. coli* REP215 endofítica de repolho a antimicrobianos. O teste sinérgico do duplo disco para detecção fenotípica de ESBL pode ser visto na região central da placa, sendo o resultado positivo indicado pela distorção da zona de inibição dos discos de β-lactâmicos da região central em direção ao disco de amoxicilina/ácido clavulânico. (b) Visão ampliada do teste sinérgico do duplo disco para *K. pneumoniae* ALF301 endofítica de alface. (c) Perfis genotípicos obtidos por ERIC-PCR das linhagens de *E. coli* endofíticas de repolho. 1 e 4, marcador *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*; 2, *E. coli* REP215; 3, *E. coli* REP237. (d) Perfis obtidos por BOX-PCR das linhagens de *E. coli* endofíticas de alface e de agrião. 1, marcador *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*; 2, *E. coli* ALF043. AMC, amoxicilina/ácido clavulânico; CAZ, ceftazidima; CRO, ceftriaxona; CTF, ceftiofur; CPM, cefepima; CFO, cefoxitina; ATM, aztreonam; ETP, ertapenem; IPM, imipenem; MER, meropenem; ENO, enrofloxacina; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina.

												CIM (µg	g/ml) ^a									
Linhagem	PTZ	CEP	CEC	CFM	CRO	CAZ	CPM	CFO	ATM	IPM	MER	ETP	GEN	AMK	NAL	CIP	ENO	LVX	MXF	SXT	CHL	TET
<i>E. cloacae</i> ESP151	≥256	≥256	≥256	96	≥32	8	12	128	32	0,75	0,094	0,25	16	4	16	0,75	0,094	0,5	0,064	≥32	≥256	6
K. pneumoniae ALF301	4	≥256	≥256	≥256	≥32	8	24	4	48	0,25	0,023	0,094	≥1024	4	3	0,125	0,047	0,064	0,032	≥32	≥256	64
K. pneumoniae RUC232	≥256	≥256	≥256	≥256	≥32	16	12	4	16	0,38	0,032	0,25	1	8	≥32	16	4	0,5	0,064	2	6	16
<i>E. coli</i> ESP110	≥256	≥256	≥256	≥256	≥32	16	4	12	32	0,25	0,094	0,19	16	8	16	1	0,047	0,25	0,032	≥32	≥256	64
E. coli REP215	4	≥256	≥256	96	≥32	8	16	12	16	0,19	0,047	0,25	48	16	≥256	≥32	≥32	≥32	≥32	≥32	6	1,5
<i>E. coli</i> REP237	≥256	≥256	≥256	≥256	≥32	24	≥32	3	24	0,38	0,032	0,19	0,5	4	6	0,5	0,064	0,25	0,125	≥32	3	192

Tabela 5. CIMs de antimicrobianos para enterobactérias endofíticas produtoras de ESBL isoladas no Brasil.

^aResistência é indicada em negrito. PTZ, piperacilina/tazobactam; CEP, cefalotina; CEC, cefaclor; CFM, cefixima; CRO, ceftriaxona; CAZ, ceftazidima; CPM, cefepima; CFO, cefoxitina; ATM, aztreonam; IPM, imipenem; MER, meropenem; ETP, ertapenem; GEN, gentamicina; AMK, amicacina; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; ENO, enrofloxacina; LVX, levofloxacina, MXF, moxifloxacina; SXT, sulfametoxazol/trimetoprima; CHL, cloranfenicol; TET, tetraciclina.

_								C	IM (µg/ml	a^{a}						
Linhagem	AMO	AMP	PIP	TMO	CTX	CAZ	ATM	ETP	MER	IPM	NAL	CIP	STR	AMK	SMX	TIG
<i>E. coli</i> ALF012	>256	>256	>256	8	16	32	48	0,012	0,008	0,094	>256	3	>256	8	>1024	0,125
E. coli ALF043	>256	>256	>256	8	8	16	32	0,008	0,004	0,0125	2	0,006	3	4	>1024	0,047
<i>E. coli</i> AGR028	>256	>256	>256	12	16	16	24	0,012	0,004	0,064	2	0,006	1,5	4	12	0,125
<i>E. coli</i> TC- ALF043	>256	>256	>256	8	8	16	16	0,004	0,015	0,125	2	0,008	1,5	0,125	3	0,125
<i>E. coli</i> TC- AGR028	>256	>256	>256	12	8	16	16	0,008	0,008	0,125	2	0,008	1,5	0,125	3	0,125
E. coli CV601	2	4	1,5	6	0,03	0,125	0,023	0,006	0,008	0,125	2	0,008	1,5	0,125	3	0,125

Tabela 6. CIMs de antimicrobianos para linhagens de *E. coli* endofíticas produtoras de ESBL isoladas em Portugal, transconjugantes e receptora.

^aResistência é indicada em negrito. AMO, amoxicilina; AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; TMO, temocilina, CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; ETP, ertapenem; MER, meropenem; IPM, imipenem; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; STR, estreptomicina; AMK, amicacina; SMX, sulfametoxazol; TIG, tigeciclina.

isolados produtores de ESBL permaneceram sensíveis aos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) e à amicacina.

5.4. Estilo de vida endofitico de enterobactérias produtoras de CTX-M-15

Para analisar o estilo de vida endofítico das linhagens produtoras de CTX-M, foi utilizado um modelo de plantas de feijoeiro comum. Nesse ensaio, a recuperação das linhagens do interior dos tecidos vegetais com a superfície desinfetada (raiz e parte aérea) foi realizada após 15 dias da inoculação. Todas as linhagens avaliadas colonizaram eficientemente o interior da raiz e da parte aérea das plantas, sendo as linhagens recuperadas idênticas às inoculadas, confirmando a capacidade de estilo de vida endofítico das mesmas. As maiores densidades das bactérias recuperadas foram encontradas nas raízes, principalmente para *K. pneumoniae* ALF301 e RUC232 ($1,6x10^5$ UFC/g e $8,7x10^4$ CFU/g, respectivamente) (P<0,05). Na parte aérea das plantas, no entanto, as maiores densidades bacterianas foram observadas para *E. cloacae* ESP151 ($2,1x10^3$ UFC/g) (P<0,05) (Tabela 7).

	$UFC/g \pm DP$						
Linhagem	Raiz	Parte aérea					
K. pneumoniae ALF301	$1,6\pm0,1x10^{5}\Delta$	$6,9\pm0,4x10^{2}\Delta$					
K. pneumoniae RUC232	$8,7\pm0,5x10^{4}$ †	3,8±0,3x10 ² †					
E. cloacae ESP151	$6,4\pm0,4x10^{4}$ ‡	$2,1\pm0,1\times10^{3}$ ‡					
E. coli REP215	3,9±0,4x10 ⁴ #	$7,0\pm0,9x10^{1}$ #					
E. coli ESP110	3,2±0,6x10 ⁴ #	$3,1\pm0,5x10^{2}$ †					
E. coli REP237	$5,1\pm0,5x10^{3*}$	$7,5\pm1,0x10^{1}$ #					
E. coli ALF012	NR	NR					
E. coli ALF043	NR	NR					
E. coli AGR028	NR	NR					
A. baumannii ATCC 19606	0,0±0,0§	$0,0\pm 0,0$ §					

Tabela 7. Densidade das linhagens endofíticas produtoras de CTX-M recuperadas da raiz e da parte aérea do feijoeiro comum após 15 dias da inoculação.

Médias \pm desvio padrão (DP) seguidas pelo mesmo símbolo na mesma coluna não diferem pelo teste de Duncan (*P*<0.05). NR, não realizado.

5.5. Genotipagem, resistoma, viruloma e genes que favorecem a associação com plantas

Todos os isolados endofíticos produtores de ESBL neste estudo tiveram o genoma sequenciado. A cobertura dos genomas variou de aproximadamente 77x a 458x e as

sequências foram montadas em 20 a 171 contigs maiores que 500 pb, produzindo *drafts* de genomas com N50 de 70.732 pb a 3.031.323 pb. O tamanho dos *drafts* dos genomas variou de 4.913.075 pb a 5.757.970 pb para *E. coli* ESP110 e *K. pneumoniae* RUC232, respectivamente (Tabela 8).

A análise dos genomas mostrou que as enterobactérias endofíticas produtoras de ESBL pertenceram a diferentes sequências tipo (STs). *E. coli* ESP110, REP215 e REP237 isoladas de espinafre e repolho do Brasil pertenceram ao ST4012, ST648 e ST38, respectivamente, enquanto que *E. coli* ALF012 e ALF043 isoladas de alface de Portugal foram atribuídas ao ST10 e *E. coli* AGR028 obtida de agrião também de Portugal pertenceu a um novo ST (ainda não designado). *K. pneumoniae* ALF301 pertenceu ao ST198 (Lopes et al., 2017) e *K. pneumoniae* RUC232 ao novo ST2739. *E. cloacae* ESP151 isolado de espinafre foi atribuído ao novo ST927.

Além disso, os sorotipos das linhagens também foram diferentes. *E. coli* ALF012, ALF043, AGR028, ESP110, REP215 e REP237 pertenceram aos sorotipos O8:H17, O12:H4, ONT(não tipado):H20, O8:H4, ONT(não tipado):H6 e O86:H18, respectivemente. *K. pneumoniae* ALF301 foi atribuída ao sorotipo K30, enquanto *K. pneumoniae* RUC232 ao K102 (Tabela 9).

A produção de ESBL foi associada com a presença do gene $bla_{CTX-M-15}$ para todas as linhagens endofíticas do Brasil e com o gene $bla_{CTX-M-14}$ para todas as linhagens endofíticas de Portugal. Outros genes de beta-lactamase também foram detectados, dos quais bla_{TEM-1B} foi identificado em cinco linhagens de *E. coli* (ALF012, ALF043, AGR028, ESP110 e REP215), *K. pneumoniae* RUC232 e *E. cloacae* ESP151. Por outro lado, bla_{OXA-1} foi detectado em todas as linhagens do Brasil, exceto em *E. coli* ESP110, mas em nenhuma das linhagens de Portugal. Adicionalmente, ambas as linhagens de *K. pneumoniae* apresentaram o gene bla_{SHV} . Além dos genes de resistência aos betalactâmicos, também foram identificados determinantes de resistência aos aminoglicosídeos (*strA*, *strB*, *aac*(*3*)–*II*, *aac*(*6'*)*Ib*–*cr*, *aadA1*, *aadA5*, *aadA12*, *aph*(*3''*)-*Ib* e *aph*(*6*)-*Id*), (fluoro)quinolonas (*aac*(*6'*)*Ib*–*cr*, *qnrB*, *oqxA*, and *oqxB*), fenicóis (*catA1*, *catB3*, *cmlA1* e *floR*), tetraciclinas (*tetA*, *tetB* e *tetX*), macrolídeos (*ermB*, *mphA* e *mdfA*) trimetoprima (*dfrA14*, *dfrA15* e *dfrA17*), sulfonamidas (*sul1* e *sul2*) e fosfomicina (*fosA*) nas linhagens endofíticas deste estudo.

Nas linhagens resistentes às (fluoro)quinolonas, ainda foram observadas mutações em regiões determinantes de resistência à essa classe de antimicrobianos. As substituições Thr-83→Ile e Ser-80→Ile resultantes de mutação em *gyrA* e *parC*, respectivamente, foram

Biblioteca							Montagem	_			
Linhagem	Tamanho do inserto (pb)	Comprimento das <i>reads</i> (pb)	Número de <i>reads</i>	Comprimento total (pb)	Contigs	Tamanho total (pb)	Maior contig (pb)	N50 (pb)	L50	Cobertura (x)	Número de acesso (GenBank)
<i>E. cloacae</i> ESP151	876	300	1.288.612	386.583.600	62	4.926.220	759.020	337.639	5	77,3	PPHP01000000
K. pneumoniae ALF301	915	300	3.260.562	978.168.600	20	5.311.340	3.031.323	3.031.323	1	163,0	MRWC01000000 KY354306.1
K. pneumoniae RUC232	864	300	2.826.989	848.096.700	103	5.757.970	337.601	120.339	15	141,3	KY495890.1 PPHO01000000
E. coli ALF012	350	150	6.459.860	1.937.958.000	128	5.068.488	400.372	147.489	12	387,6	Em processamento
E. coli ALF043	350	150	7.629.500	2.288.850.000	160	4.944.129	295.880	93.588	19	457,8	Em processamento
E. coli AGR028	350	150	5.179.720	1.553.916.000	49	4.944.591	513.314	259.750	8	310,8	Em processamento
E. coli ESP110	912	300	1.558.628	467.558.400	142	4.913.075	196.967	70.732	21	93,5	PPHN01000000
E. coli REP215	923	300	1.427.014	428.104.200	154	5.418.874	366.651	122.855	13	85,6	PPHM01000000
E. coli REP237	858	300	1.592.584	477.775.200	171	5.248.431	427.664	122.281	13	95,6	PPHL01000000

Tabela 8. Resumo dos dados da construção das bibliotecas e montagem dos genomas de enterobactérias endofíticas.

	MIGT		0		Resistoma		Plasmídeos			
Linhagem	MLS1 ST/CC	Filogrupo	Sorotipo ^a	Genes de virulência	Genes de resistência antimicrobiana	Mutações em RDRQ ^b	Grupo de incompatibilidade ^c	Frequência de conjugação (UFC/receptora)	Eficiência de transformação (UFC/µg de plasmídeo)	
E. cloacae ESP151	927 (singleton)	-	NT	csgA, csgB, csgC, csgD, csgE csgF csgG, yidE	bla _{CTX-M-15} , bla _{OXA-1} , bla _{TEM-1B} , bla _{ACT-7} , strA, strB, aac(3)-IIa, aac(6')Ib-cr, aadA1, qnrB1, sul2, dfrA14, catA1, catB3, tetA, fosA	-	<u>HI2A</u>	-	1,05x10 ⁶	
K. pneumoniae ALF301	198/198	-	K30	fyuA, irp2, ybtA, ybtP, ybtQ, ybtS, ybtT, ybtU, ybtX, mrkA, mrkB, mrkH, mrkI	bla _{CTX-M-15} , bla _{OXA-1} , bla _{SHV-11} , aac(3)-IIa, aac(6')Ib-cr, oqxA, oqxB, dfrA14, catA1, catB3, tetA, fosA	-	<u>FIB, FII</u>	-	6,12x10 ⁵	
K. pneumoniae RUC232	2739 (singleton)	-	K102	mrkA, mrkB, mrkC, mrkD, mrkF, mrkH, mrkI, mrkJ	bla _{CTX-M-15} , bla _{OXA-1} , bla _{TEM-1B} , bla _{SHV-28} , strA, strB, aac(6')lb-cr, qnrB66, oqxA, oqxB, sul2, catB3, tetA, fosA	gyrA (Thr-83 \rightarrow Ile), parC (Ser-80 \rightarrow Ile)	<u>FIB, FII</u> , ColRNAI	-	4,95x10 ⁵	
E. coli ALF012	10/10	A	O8:H17	astA, cma	bla _{CTX-M-14} , bla _{TEM-1B} , aadA5, aadA12, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, sul1, sul2, dfrA17, tetA, tetX, ermB, mdfA	gyrA (Ser-83 \rightarrow Leu, Asp-87 \rightarrow Asn), parC (Ser-80 \rightarrow Ile)	FIB, FII, <u>I1</u> , Q1	-	-	
E. coli ALF043	10/10	А	O12:H4	iss, gad, iha, sat	bla _{CTX-M-14} , bla _{TEM-1B} , aadA2, sul1, dfrA15, tetB, cmlA1, ermB, mdfA	-	<u>11</u>	8,02x10 ⁻³	-	
E. coli AGR028	Novo (em processamento)	D	ONT:H20	gad, air, eilA, lpfA	bla _{CTX-M-14} , bla _{TEM-1B} , ermB, mdfA	-	<u>11</u>	7,45x10 ⁻³	-	
E. coli ESP110	4012 (singleton)	A	O8:H4	iss, gad	bla _{CTX-M-15} , bla _{TEM-1B} , strA, strB, aacA4, aac(3)-IId, aac(6`)Ib-cr, aadA5, sul2, dfrA17, tetA, cmlA1, floR	-	<u>FIA, FIB, FII</u>	5,14x10 ⁻³	-	
E. coli REP215	648/648	D	ONT:H6	gad, air, eilA, lpfA, sat, senB	bla _{CTX-M-15} , bla _{OXA-1} , bla _{TEM-1B} , aac(3)-IIa, aac(6')lb-cr, aadA5, sul1, dfrA17, catB3, ermB, mphA	$gyrA$ (Ser-83 \rightarrow Leu, Asp-87 \rightarrow Asn), $parC$ (Ser-80 \rightarrow Ile)	<u>FIA, FIB, FII</u> , I2, ColRNAI, Col, Col156	8,67x10 ⁻⁴	-	
E. coli REP237	38/38	D	O86:H18	gad, air, eilA, nfaE, senB	bla _{CTX-M-15} , bla _{OXA-1} , aac(6')Ib-cr, aadA5, sul1, dfrA17, catB3, tetA, mphA	-	<u>FIA, FIB, FII,</u> Col156	2,33x10 ⁻³	-	

Tabela 9. Características genômicas de Enterobacteriaceae endofíticas multirresistentes produtoras de CTX-M.

^aNão tipado (NT); ^bRegiões determinantes de resistência às quinolonas (RDRQ); ^cGrupos de incompatibilidade de plasmídeos carreadores de *bla*_{CTX-M}estão sublinhados.

detectadas em *K. pneumoniae* RUC232, enquanto que as substituições Ser-83 \rightarrow Leu e Asp-87 \rightarrow Asn codificadas em gyrA e Ser-80 \rightarrow Ile em parC foram encontradas em *E. coli* REP215 e ALF012 (Tabela 9). Adicionalmente, foram identificados *clusters* gênicos de resistência a metais pesados, tais como *cusSRCFBA*, *copE2ABCDRSE1* e *arsRDABC* que codificam resistência a cobre/prata, cobre e arsênio, respectivamente, na linhagem endofítica *K. pneumoniae* ALF301 isolada de alface do Brasil.

Múltiplos genes associados à virulência também foram encontrados nas enterobactérias endofíticas. Nas linhagens de E. coli, foram identificados os genes air (codificador de monômero de imunoglobulina enteroagregativa), eilA (envolvido em aderência e formação de biofilme), nfaE (adesina fibrilar), iha (adesina), lpfa (envolvido na formação de fímbria), gad (glutamato descarboxilase), iss (envolvido no aumento de sobrevivência no soro), sat (toxina secretada), astA (toxina termoestável EAST-1), senB (enterotoxina plasmidial) e cma (colicina M). E. coli AGR028, REP215 e REP237 pertenceram ao altamente virulento filogrupo D, enquanto E. coli ALF012, ALF043 e ESP110 foram atribuídas ao filogrupo A, o qual é frequentemente associados a linhagens comensais de baixa virulência (Clermont et al., 2013). Nas linhagens de K. pneumoniae, os genes de virulência encontrados foram fyuA (codificador de receptor do sideróforo yersiniabactina), *irp2* e genes *ybt* (envolvidos na síntese de yersiniabactina), além de genes mrk (codificadores de fímbrias do tipo 3, relacionadas à formação de biofilme). Em E. cloacae ESP151, yidE (responsável por hiper-aderência a células hospedeiras de animais e plantas) (Torres e Kaper, 2003; Torres et al., 2005) e os operons csgBA and csgDEFG (codificadores de fímbrias curli) foram encontrados (Tabela 9).

Com relação aos genes que favorecem a associação bacteriana com plantas, os determinantes genéticos incluíram operons responsáveis pela assimilação de nitrato (*narGHJI*, *napFDAGHBC* e *narZYWV* – codificadores de nitrato redutases -, e *nrfABCDEFG* e *nirBDC* - codificadores de nitrito redutases), o qual é a principal fonte de nitrogênio para plantas em solos fertilizados, bem como genes codificadores de celulases (*celA* e *celB*) em todas as linhagens endofíticas deste estudo. Genes envolvidos na biossíntese de 2,3-butanediol (*budABC*) e solubilização de fosfato (*pqqABCDEF*), os quais podem estar associados à promoção de crescimento vegetal (Liu et al., 2016), foram identificados nas linhagens de *K. pneumoniae* e *E. cloacae*. Gene codificador de quitinase (*chiC*), frequentemente relacionado à atividade contra fitopatógenos (Kobayashi et al., 2002), foi detectado em *E. coli* ALF043 e ESP110, *K. pneumoniae* ALF301 e RUC232 e *E. cloacae* ESP151.

5.6. Plasmídeos e transferência horizontal

Plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade foram encontrados nas linhagens de enterobactérias endofíticas deste estudo. No entanto, enquanto que, em *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas de amostras do Brasil, $bla_{CTX-M-15}$ foi carreado plasmídeos do IncF (IncFIA, IncFIB e IncFII), esse gene foi carreado por um plasmídeo do IncHI2A em *E. cloacae* ESP151. Por outro lado, nas linhagens de *E. coli* endofíticas isoladas de amostras de Portugal, $bla_{CTX-M-14}$ foi carreado por plasmídeos do IncII (Tabela 9).

Dois plasmídeos de *K. pneumoniae* ALF301 isolada de alface do Brasil foram montados (Figura 7). O maior, denominado pKP301cro, possui 147.442 pb, conteúdo G+C de 50,78% e 136 sequências codificadoras de proteínas, incluindo *bla*_{CTX-M-15} e os *clusters* gênicos *cusSRCFBA*, *copE2ABCDRSE1* e *arsRDABC* codificadores de resistência a metais pesados (cobre, prata e arsênio) (item 5.5). Esse plasmídeo foi mais similar ao plasmídeo p6234-198.371kb, carreador de *bla*_{CTX-M-15}, de *K. pneumoniae* de origem hospitalar humana da Colômbia. A similaridade entre eles foi principalmente nas regiões codificadoras da replicação, particionamento/manutenção, transferência conjugativa e resistência aos metais pesados. As principais diferenças estão em regiões de elementos transponíveis (Figura 8). O menor plasmídeo de *K. pneumoniae* ALF301, pKP301b, apresenta 110.253 pb, conteúdo G+C de 48,35% e 130 sequências codificadoras de proteínas, mas não possui genes de resistência a antimicrobianos ou a metais pesados. Ele



Figura 7. Plasmídeos de *K. pneumoniae* ALF301. (a) Plasmídeo pKP301cro (GenBank: KY495890.1) carreador de $bla_{CTX-M-15}$ (em vermelho) e genes de resistência a metais pesados. (b) Plasmídeo pKP301b (GenBank: KY354306.1) não carreador de genes de resistência. Azul, sequências codificadoras de proteínas; cinza, elementos transponíveis; preto, conteúdo G+C; verde, variação positiva de G+C; roxo, variação negativa de G+C.



Trun

ISEcp1

Figura 8. (a) Comparação de plasmídeos IncF carreadores de genes de β-lactamases. Baixas identidades (70%-50%) são indicadas por tons mais claros das cores. Identidades <50% aparecem como espaços em branco. Rosa, pLGP4 (GenBank: MF116002.1); verde, p6234-198.371kb (GenBank: CP010390.1); amarelo, pKPSH11 (GenBank: KT896504.1); azul, pKP301cro (GenBank: KY495890.1); e roxo, pKPN3-307_typeD (GenBank: KY271407.1) são plasmídeos de bactéria não cultivável e linhagens de *K. pneumoniae* isoladas de fluido corporal, água residual, alface e aspirado brônquico, respectivamente. Arcos pretos representam elementos transponíveis de pKP301cro. (b) Comparação de pKP301cro e p6234-198.371kb. O sombreamento cinza indica regiões de homologia, enquanto o sombreamento azul indica regiões homólogas invertidas. Sequências codificadoras de proteínas são representadas por setas pretas. (c) Região mostrando a ligação de genes de resistência a prata/cobre (*cusSRCFBA*) (azul), cobre (*copE2ABCDRSE1*) (laranja), arsênio (*arsRDABC*) (verde) e β-lactâmicos (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1} e/ou *bla*_{OXA-1}) (vermelho) em diferentes plasmídeos de *K. pneumoniae*; pRJ119-NDM1 (GenBank: KX636095.1). Sequências codificadoras de proteínas são mostradas em cinza. As coordenadas das regiões mostradas são indicadas entre parênteses.

mostrou maior similaridade de nucleotídeos com os plasmídeos pF77_2 (GenBank: CP026138.1) e p2_020143 (GenBank: CP028544.1), que também não são carreadores de genes de resistência, mas foram de linhagens de *K. pneumoniae* de origem hospitalar humana da China.

Neste trabalho, todos os plasmídeos carreadores de genes bla_{CTX-M} de *E. coli* endofíticas, exceto *E. coli* ALF012, foram transferíveis horizontalmente por conjugação. A frequência de conjugação das linhagens carreadoras de $bla_{CTX-M-15}$ variou de 8,67x10⁻⁴ a 5,14x10⁻³ transconjugantes/receptora, enquanto que para as linhagens carreadoras de $bla_{CTX-M-15}$ variou de $bla_{CTX-M-14}$ foi de 7,45x10⁻³ a 8,02x10⁻³ transconjugantes/receptora. Para *K. pneumoniae* e *E. cloacae*, os plasmídeos extraídos foram utilizados para a transformação de *E. coli* TOP10. A eficiência de transformação utilizando os plasmídeos das outras espécies variou de 4,95x10⁵ a 1,05x10⁶ transformantes/µg de plasmídeo (Tabela 9).

5.7. Contextos genéticos de bla_{CTX-M-15}

Três diferentes contextos genéticos de $bla_{CTX-M-15}$ foram encontrados nas enterobactérias endofíticas isoladas no Brasil (Figura 9). *E. coli* REP215, *K. pneumoniae* ALF301 e RUC232 e *E. cloacae* ESP151 apresentaram o contexto genético internacional IS*Ecp1-bla*_{CTX-M-15}-*orf477* disseminado globalmente (Figura 9a). Além disso, dois novos contextos foram encontrados nas linhagens de *E. coli* REP237 e ESP110 isoladas de repolho e espinafre, respectivamente. No contexto genético Δ IS26- Δ IS*Ecp1-bla*_{CTX-M-15}*orf477* de *E. coli* REP237, uma IS*Ecp1* de 1.171 pb foi truncada por uma IS26 incompleta *upstream* do gene *bla*_{CTX-M-15}, enquanto que, no contexto IS26- Δ IS*Ecp1-bla*_{CTX-M-15}-*orf477* de *E. coli* ESP110, uma IS*Ecp1* de 494 pb foi truncada por uma IS26 invertida (Figura 9b e 9c).



Figura 9. Representação esquemática dos contextos genéticos de *bla*_{CTX-M-15} em *Enterobacteriaceae* endofíticas. (a) Contexto genético prevalente em todo o mundo e encontrado em linhagens endofíticas de *E. coli, K. pneumoniae* e *E. cloacae* (GenBank: MG844168.1; MG844171.1; MG844172.1; MG844173.1). Contextos encontrados em (b) *E. coli* REP237 ST38 (GenBank: MG844170.1) e (c) *E. coli* ESP110 ST4012 (GenBank: MG844169.1).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo realizado para avaliar a ocorrência de bactérias endofíticas multirresistentes em hortaliças comerciais, a densidade de bactérias endofíticas não suscetíveis à ceftriaxona ou à cefotaxima de diversas amostras, tanto do Brasil quanto de Portugal, esteve na ordem de 10^2 a 10^3 UFC/g. Esses valores podem ser considerados altos, uma vez que a densidade populacional de bactérias endofíticas isoladas em meio sem antibacteriano tem sido descrita de 10^2 a 10^9 UFC/g (Bell et al., 1995; Van Overbeek e Van Elsas, 2008, Costa et al., 2012; Zhu et al., 2016).

Além disso, vários fatores podem influenciar a densidade de bactérias endofíticas, principalmente a espécie de planta e o órgão analisado (Chi et al., 2005; Tanuja et al., 2013), o estágio de desenvolvimento (Van Overbeek e Van Elsas, 2008; Inceoglu et al., 2010; Tanuja et al., 2013), a cultivar (genótipo) (Inceoglu et al., 2010; Costa et al., 2012), a interação com outros organismos (Lian et al., 2008; Liu et al., 2013) e fatores relacionados às condições ambientais (Thomas, et al., 2008; Kang et al., 2016; Zhu et al., 2016).

Espécies da família *Enterobacteriaceae* colonizam e favorecem o crescimento de plantas em várias culturas, como trigo, milho e arroz (Chelius et al., 2000; Shankar et al., 2011; Iniguez et al., 2014). No entanto, enterobactérias produtoras de ESBL, incluindo variantes de CTX-M, também têm sido relatadas em diversos vegetais, os quais representam uma possível rota para a disseminação de bactérias multirresistentes e determinantes de resistência na comunidade (Olaimat et al., 2012; Bayer et al., 2014; Lopes et al., 2017; Hölzel e al., 2018; Mogren et al., 2018).

A disseminação de bactérias produtoras de β -lactamases adquiridas na comunidade é um assunto de grande interesse e importância para a saúde pública, visto à facilidade de mobilização dos genes por transferência horizontal, especialmente por plasmídeos altamente promíscuos. Neste estudo, a porcentagem de vegetais analisados que apresentou bactérias produtoras de ESBL foi de 10,4% das amostras do Brasil e 8,3% das amostras de Portugal. Esses valores estão dentro da faixa em que a ocorrência de bactérias produtoras de ESBL em vegetais frescos tem sido descrita na literatura, variando de 6% a 25,4% das amostras em países americanos, asiáticos e europeus (Raphael et al., 2011; Reuland et al., 2014; Zurfluh et al., 2015).

De acordo com o nosso conhecimento, esta é a primeira análise abrangente com foco em enterobactérias endofíticas produtoras de CTX-M, o tipo de ESBL de maior predominância na comunidade. Enquanto estudos anteriores consideraram o número total de bactérias associadas a vegetais, este trabalho analisou especificamente as bactérias endofíticas. Essa é uma diferença importante considerando que os métodos de desinfecção normalmente mostram-se eficazes contra as bactérias da superfície dos vegetais (Olmez e Temur, 2010), enquanto que bactérias endofíticas colonizam sítios protegidos dos tecidos internos e resistem a esses métodos (Olmez e Temur, 2010; Olaimat e Holley, 2012). Desta forma, bactérias endofíticas multirresistentes poderiam colonizar hospedeiros que usam vegetais na dieta.

No Brasil, bactérias produtoras de ESBL têm sido mais desafiadoras do que em muitos países desenvolvidos. De fato, *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL são endêmicas em ambientes hospitalares brasileiros (Gales et al., 2012), enquanto que, para infecções adquiridas na comunidade, produtores de ESBL têm sido relatados em até 7,6% dos isolados (Abreu et al., 2013). *K. pneumoniae* e *E. coli* são as espécies mais comumente associados com a produção de ESBL, das quais CTX-M-15 é uma das variantes de maior predominância em nível global (Bevan et al., 2017). Preocupantemente, produtores de CTX-M-15 também têm sido identificados em animais saudáveis e doentes (Silva et al., 2016; Sartori et al., 2017; Melo et al, 2018) e no ambiente no Brasil (Oliveira et al., 2016; Dropa et al., 2016), porém vegetais apresentando produtores de ESBL não foram investigados em detalhes no país.

Embora a origem das bactérias endofíticas produtoras de CTX-M encontradas neste estudo não seja certa, elas poderiam ser originar de fontes humanas (como esgoto), animais (adubos orgânicos e fezes de animais selvagens ou domésticos) e ambientais (como solo e água de irrigação contaminados) que entrem em contato com as culturas agrícolas (Warriner et al., 2009; Han et al., 2016). A colonização da planta pode ocorrer através de portas de entrada como estômatos, lenticelas, tricomas radiculares, lesões e superfícies emergentes de raízes laterais e de radículas germinativas (Hardoim et al., 2015). A introdução direta dessas bactérias na planta possivelmente combinada com seleção *in situ* pode ocorrer. Esta hipótese é suportada pela presença de bactérias endofíticas pertencentes a clones de alto risco transportando o ambiente genético internacional de *bla*_{CTX-M-15} (*E. coli* ST648), bem como bactérias produtoras de CTX-M pertencentes a novos STS (*E. colacae* ST927, *K. pneumoniae* ST2739 e *E. coli* ST4012), como encontrado neste estudo.

O achado das variantes CTX-M-15 e CTX-M-14 produzidas por bactérias endofíticas reflete o padrão epidemiológico mundial, em que essas são as variantes mais descritas em humanos, em animais e no ambiente (Lahlaoui et al., 2014). No Brasil, CTX-

M-15 é uma das variantes de maior prevalência e tem se tornado dominante nos últimos anos (Rocha et al., 2016; Bevan et al., 2017), enquanto que, em Portugal, o predomínio de CTX-15 e CTX-M-14 tem sido reportado (Bevan et al., 2017). Especialmente o relato de bactérias endofíticas produtoras de CTX-M-15 em vegetais comerciais do Brasil é um achado preocupante, uma vez que o gene $bla_{CTX-M-15}$ é o mais comum em enterobatérias produtoras de ESBL causadoras de doença (Hawkey et al., 2009; Bevan et al., 2017). Além disso, a β -lactamase OXA-1, que foi associado com CTX-M-15 na maioria das linhagens endofíticas deste estudo, pode hidrolisar significativamente as aminopenicilinas e ureidopenicilinas, bem como hidrolisar fracamente as cefalosporinas de espectro reduzido e algumas cefalosporinas de amplo espectro, resultando em suscetibilidade reduzida à cefepima e cefpiroma (Zhou et al., 1994).

De especial atenção à saúde pública, é o relato de linhagens de E. coli endofíticas produtoras de CTX-M-15 pertencentes ao ST38 e ao ST648. Linhagens desses STs são disseminadas globalmente, sendo relatadas em isolados de origem humana e animal (Cao et al., 2014; Guo et al., 2015; Hasan et al., 2016), e estão envolvidas em doencas extraintestinais, principalmente infecções do trato urinário. No Brasil, linhagens de E. coli ST648 produtoras de CTX-M-15 foram isoladas de infecções no trato urinário adquiridas em hospitais e na comunidade (Paiva et al., 2013; Gonçalves et al., 2016; Campos et al., 2018). E. coli pertencentes aos ST38 e ST648 também têm sido descritas como carreadoras de outros bla_{CTX-M} além de bla_{CTX-M-15} (Peng e Zong, 2011; Cao et al., 2014; Guo et al., 2015; Müller et al., 2016), contribuindo para a disseminação global dos genes codificadores de ESBL (Pitout et al., 2012; Cao et al., 2014; Hasan et al., 2016). A outra linhagem de *E. coli* endofítica isolada de amostras brasileiras pertenceu ao ST4012, o qual foi previamente reportado somente em isolados fecais de humanos, mas não carreadores de *bla*_{CTX-M} (Stoesser et al., 2015). Além disso, plasmídeos do IncF encontrados nas linhagens endofíticas isoladas de amostras do Brasil estão entre os principais responsáveis pela rápida disseminação horizontal de genes de resistência entre bactérias gram-negativas (Carattoli et al., 2009; Carattoli et al., 2013).

Por outro lado, *E. coli* ST10 é mais reconhecida por seu potencial zoonótico (Cao et al., 2014; Day et al., 2016; Hasan et al., 2016). Interessantemente, linhagens de *E. coli* multirresistentes do mesmo ST foram previamente isoladas de amostras de água e de alface em propriedades rurais de Portugal (Araújo et al., 2017). No entanto, essas linhagens não foram produtoras de ESBL, enquanto que as linhagens de *E. coli* ST10 endofíticas deste

estudo foram produtoras de CTX-M-14 codificada em plasmídeos do IncI1, os quais tem sido frequentemente reportados como carreadores de $bla_{CTX-M-14}$ (Zhao e Hu, 2013).

Foi também encontrada associação entre os STs e os filogrupos de virulência, corroborando dados previamente reportados na literatura. Os ST38 e ST648 estão associados ao altamente virulento filogrupo D, frequentemente relacionado a linhagens extra-intestinais produtoras de toxinas (Harada et al., 2012; Müller et al., 2016). Já os ST10 e ST4012 estão associados ao filogrupo A de baixa virulência (Giufrè et al., 2012; Stoesser et al., 2015). Embora linhagens com genes de virulência possam estar presentes na microbiota comensal de animais e humanos sem causar sintomas de doença (Cabal et al., 2015; Cabal et al., 2016), elas representam um risco potencial para a saúde dos indivíduos portadores. Ademais, a associação de genes de virulência com genes de resistência a múltiplos antimicrobianos torna a situação mais preocupante. Por um lado, o uso de antimicrobianos pode promover a seleção de bactérias portadoras de genes de virulência, levando ao aumento da frequência desses genes na população bacteriana. Por outro, genes de virulência podem contribuir para a disseminação de bactérias patogênicas e seus genes de resistência (Boerlin et al., 2005).

Em relação ao sorotipo das linhagens endofíticas, *K. pneumoniae* ALF301 pertenceu ao sorotipo K30 e *K. pneumoniae* RUC232 ao sorotipo K102. As linhagens de *E. coli* apresentaram os sorotipos O8:H17, O12:H4, ONT(não tipado):H20, O8:H4, ONT:H6 e O86:H18. Embora nenhum dos sorotipos encontrados seja associado a linhagens pandêmicas, linhagens de *E. coli* ST38/O86:H18 constituíram o grupo clonal mais comum em surtos de infecção hospitalar causadas por *E. coli* patogênica extra-intestinal produtora de ESBL no Japão (Suzuki et al., 2009).

Adicionalmente, é provável que a seleção de bactérias endofíticas produtoras de CTX-M seja auxiliada por resíduos de metais pesados nas culturas agrícolas. Uma evidência de que essa hipótese é verdadeira é a presença de plasmídeos em que coexistem genes de resistência a antimicrobianos, como o $bla_{CTX-M-15}$, e genes de resistência a metais pesados, como *cusSRCFBA*, *copE2ABCDRSE1* e *arsRDABC* em bactérias endofíticas. Além de solo e da água de irrigação contaminados, os metais pesados podem ter origem em fertilizantes inorgânicos e pesticidas comumente usados em práticas agrícolas (Sipter et al., 2008; Kananke et al., 2014) e permanecerem no ambiente por longos períodos, bem como se acumularem nas folhas, caule e raiz das plantas (Gimeno-Garcia et al., 1996; Osaili et al., 2016). Portanto, pode haver uma forte associação entre a presença de resíduos de metais pesados nas culturas e a ocorrência e persistência de plasmídeos que conferem

resistência a múltiplos antimicrobianos em bactérias endofíticas. Embora a co-seleção de resistência a antimicrobianos e a metais tenha sido relatada em bactérias clínicas e de determinados ambientes não clínicos (Baker-Austin et al., 2006; Fang et al., 2016; Henriques et al., 2016), esse achado em bactérias endofíticas é uma indicação da crescente disseminação da resistência.

É possível ainda que determinados mecanismos de resistência têm sido mantidos em bactérias endofíticas por razões adicionais à resistência aos antimicrobianos, tais como a proteção contra metabólitos vegetais tóxicos, muitos dos quais têm estruturas similares a antimicrobianos. Por exemplo, foi notado previamente que, em E. coli e K. pneumoniae, há uma alta associação entre tolerância à solvente orgânico e mutantes resistentes a fluoroquinolonas (Aathithan e French, 2009; Lautenbach et al., 2010). Isolados clínicos de K. pneumoniae tolerantes a solvente orgânico ainda super-expressaram acrA, que codifica uma proteína da bomba de efluxo AcrAB-TolC de múltiplos antimicrobianos (Schneiders et al., 2003). Em Salmonella, linhagens resistentes a ciclohexano apresentaram resistência aumentada a múltiplos antimicrobianos, desinfetantes e corantes em relação a linhagens suscetíveis ao solvente (Randall et al., 2001). Além disso, a resistência às quinolonas comumente prescritas, como ciprofloxacina, é aumentada quando são co-administradas com ácido salicílico (Berlanga e Vinas, 2000; Begic e Worobec, 2007). Embora isso tenha sido observado no contexto de co-tratamentos em ambientes clínicos, é possível que a indução da resistência a antimicrobianos poderia ser uma consequência da resposta natural de bactérias associadas a plantas ao ácido salicílico, que é um importante hormônio vegetal envolvido na sinalização de respostas de defesa contra infecções bacterianas e estresses abióticos, além de possuir papel também na floração, crescimento e desenvolvimento da planta (Raskin, 1992; Rivas-San Vicente e Plasencia, 2011).

7. CONCLUSÕES

A emergência de enterobactérias endofíticas produtoras de ESBL (CTX-M) em vegetais é um relato importante para a saúde pública, pois os vegetais são frequentemente consumidos crus e as bactérias endofíticas resistem aos métodos convencionais de desinfecção dos mesmos. Nesse sentido, vegetais comercializados para o consumo alimentar podem ter uma relevância maior do que se pensava até então na transmissão de bactérias carreadoras de genes de resistência clinicamente significantes para humanos e animais, representando assim uma ameaça à saúde pública. Medidas apropriadas, como a melhoria das práticas agrícolas e da qualidade da água de irrigação, além de regulamentações mais rigorosas, contribuirão para aumentar a segurança alimentar. Considerando ainda o papel crescente do Brasil para o abastecimento do mercado global, é necessária a instauração de programas de vigilância que investiguem bactérias emergentes de relevância clínica em culturas agrícolas com o intuito de controlar a sua disseminação e de seus genes de resistência na comunidade, uma vez que a dose infecciosa pode ser muito baixa.

REFERÊNCIAS

Aathithan, S.; French, G. L. Organic solvent tolerance and fluoroquinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **J Antimicrob Chemother**, v. 64, p. 870-871, 2009.

Abadias, M.; Alegre,I.; Usall, J.; Torres, R.; Viñas, I. Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple. **Post harvest Biol Technol**, v. 59, p. 289-297, 2011.

Abadias, M.; Usall, J.; Anguera, M.; Solsona, C.; Vinas, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. **Int J Food Microbiol**, v. 123, p. 121-129, 2008.

Abreu, A. G.; Marques, S. G.; Monteiro-Neto, V.; Goncalves, A. G. Extendedspectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community-acquired urinary tract infections in São Luís, Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 44, p. 469-471, 2013.

Ahmed, W.; Sawant, S.; Huygens, F.; Goonetilleke, A.; Gardner, T. Prevalence and occurrence of zoonotic bacterial pathogens in surface waters determined by quantitative PCR. **Water Res**, v. 43, p. 4918-4928, 2009.

Alghoribi, M. F.; Gibreel, T. M.; Farnham, G.; Al Johani, S. M.; Balkhy, H. H.; Upton, M. Antibiotic-resistant ST38, ST131 and ST405 strains are the leading uropathogenic *Escherichia coli* clones in Riyadh, Saudi Arabia. J Antimicrob Chemother, v. 70, p. 2757-2762, 2015.

Ali, M. H. H.; Al-Qahtani, K. M. Assessment of some heavy metals in vegetables, cereals and fruits in Saudi Arabian markets, Egypt. **J Aquat Res**, v. 38, p. 31–37, 2012.

Allende, A.; Martinez, B.; Selma, V.; Gil, M. I.; Suarez, J. E.; Rodriguez, A. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. **Food Microbiol**, v. 24, p. 759-766, 2007.

Amos, G. C.; Hawkey, P. M.; Gaze, W. H.; Wellington, E. M. Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. J Antimicrob Chemother, v. 69, p. 1785-1791, 2014.

Anderson, K. F.; Lonsway, D. R.; Rasheed, J. K.; Biddle, J.; Jensen, B.; Mcdougal, L. K., et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol, v. 45, p. 2723-2725, 2007.

Andrade, L. N.; Vitali, L.; Gaspar, G. G.; Bellissimo-Rodrigues, F.; Martinez, R.; Darini, A. L. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. **J Clin Microbiol**, v. 52, p. 2530-2535, 2014.

Angiuoli, S. V.; Gussman, A.; Klimke, W.; Cochrane, G.; Field, D.; Garrity, G., et al. Toward an online repository of standard operating procedures (sops) for (meta)genomic annotation. **OMICS**, v. 12, p. 137-141, 2008.

Araújo, W. L.; Maccheroni, W., Jr.; Aguilar-Vildoso, C. I.; Barroso, P. A.; Saridakis, H. O.; Azevedo, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Can J Microbiol**, v. 47, p. 229-236, 2001.

Arunachalam, C.; Gayathri, P. Studies on bioprospecting of endophytic bacteria from the medicinal plant of *Andrographis paniculata* for their antimicrobial activity and antibiotic susceptibility pattern. **Int J Curr Pharm Res**, v. 2, p. 63-68, 2010.

Aruscavage, D.; Lee, K.; Miller, S.; Lejeune, J. T. Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. **J Food Sci**, v. 71, p. 89-99, 2006.

Ashraf, S.; Afzal, M.; Naveed, M.; Shahid, M.; Ahmad Zahir, Z. Endophytic bacteria enhance remediation of tannery effluent in constructed wetlands vegetated with *Leptochloa fusca*. **Int J Phytoremediation**, v. 20, p. 121-128, 2018.

Baker-Austin, C.; Wright, M. S.; Stepanauskas, R.; Mcarthur, J. V. Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends Microbiol**, v. 14, p. 176-182, 2006.

Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A. A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A. S., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **J Comput Biol**, v. 19, p. 455-477, 2012.

Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**, v. 45, p. 493-496, 1966.

Bayer, C.; Bernard, H.; Prager, R.; Rabsch, W.; Hiller, P.; Malorny, B.; et al. An outbreak of *Salmonella* Newport associated with mung bean sprouts in Germany and the Netherlands, October to November 2011. **Euro Surveill**, v. 19, p. 20665, 2014.

Beceiro A.; Bou G. Class C β -lactamases: an increasing problem worldwide. **Rev Med Microbiol**, v. 15, p. 141-152, 2004.

Begic, S.; Worobec, E. A. Fluoroquinolone resistance of *Serratia marcescens*: sucrose, salicylate, temperature, and pH induction of phenotypic resistance. **Can J Microbiol**, v. 53, p. 1239-1245, 2007.

Bell, C. R.; Dickie, G. A.; Harvey, W. L. G.; Chan, J. Endophytic bacteria in grapevine. Can J Microbiol, v. 41, p. 46-53, 1995.

Berlanga, M.; Vinas, M. Salicylate induction of phenotypic resistance to quinolones in *Serratia marcescens*. J Antimicrob Chemother, v. 46, p. 279-282, 2000.

Beuchat, L. R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes Infect**, v. 4, p. 413-423, 2002.

Bevan, E. R.; Jones, A. M.; Hawkey, P. M. Global epidemiology of CTX-M betalactamases: Temporal and geographical shifts in genotype. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, p. 2145-2155, 2017.

Birnboim, H. C.; Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res, v. 7, p. 1513-1523, 1979.

Boerlin, P.; Travis, R.; Gyles, C. L.; Reid-Smith, R.; Janecko, N.; Lim, H., et al. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, p. 6753-6761, 2005.

Bogaerts, P.; Huang, T. D.; Rezende de Castro, R.; Bouchahrouf, W.; Glupczynski, Y. Could *Acinetobacter pittii* act as an NDM-1 reservoir for *Enterobacteriaceae*? J Antimicrob Chemother, v. 68, p. 2414-2415, 2013.

Bonnet, R.; Dutour, C.; Sampaio, J. L.; Chanal, C.; Sirot, D.; Labia, R., et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution asp-240-->gly. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 2269-2275, 2001.

Bonomo, R. A. β -lactamases: A focus on current challenges. Cold Spring Harb Perspect Med, v. 7, p., 2017.

Botelho, L. A.; Kraychete, G. B.; Costa, E. S. J. L.; Regis, D. V.; Picao, R. C.; Moreira, B. M., et al. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 249-254, 2015.

Bradford, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, p. 933-951, 2001.

Brandl, M. T. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. **Annu Rev Phytopathol**, v. 44, p. 367-392, 2006.

Braz, V. S.; Furlan, J. P. R.; Passaglia, J. ; Falcao, J. P.; Stehling, E.G. Genotypic diversity and presence of β -lactamase encoding genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian soils. **Appl Soil Ecol**, v. 129, p. 94-97, 2018.

Brenwald, N. P.; Jevons, G.; Andrews, J.; Ang, L.; Fraise, A. P. Disc methods for detecting AmpC β -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother, v. 56, p. 600-601, 2005.

Buck, J. W.; Walcott, R. R.; Beuchat, L. R. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. **Plant Health Prog**, doi:10.1094/PHP-2003-0121-01-RV, 2003.

Bush, K.; Jacoby, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, p. 969-976, 2010.

Bush, K.; Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, p. 1211-1233, 1995.

Cabal, A.; Garcia-Castillo, M.; Canton, R.; Gortazar, C.; Dominguez, L.; Alvarez, J. Prevalence of *Escherichia coli* virulence genes in patients with diarrhea and a subpopulation of healthy volunteers in Madrid, Spain. **Front Microbiol**, v. 7, p. 641, 2016.

Cabal, A.; Geue, L.; Gomez-Barrero, S.; Barth, S.; Barcena, C.; Hamm, K., et al. Detection of virulence-associated genes characteristic of intestinal *Escherichia coli* pathotypes, including the enterohemorrhagic/enteroaggregative O104:H4, in bovines from Germany and Spain. **Microbiol Immunol**, v. 59, p. 433-442, 2015.

Campana, E. H.; Barbosa, P. P.; Fehlberg, L. C.; Gales, A. C. Frequency of plasmid-mediated AmpC in Enterobacteriaceae isolated in a Brazilian Teaching Hospital. **Braz J Microbiol**, v. 44, p. 477-480, 2013.

Campos, A. C. C.; Andrade, N. L.; Ferdous, M.; Chlebowicz, M. A.; Santos, C. C.; Correal, J. C. D., et al. Comprehensive molecular characterization of *Escherichia coli* isolates from urine samples of hospitalized patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Front Microbiol**, v. 9, p. 243, 2018.

Campos, J. C.; da Silva, M. J.; dos Santos, P. R.; Barros, E. M.; Pereira, M. O.; Seco, B. M.; et al. Characterization of Tn*3000*, a transposon responsible for *bla*_{NDM}-1
dissemination among *Enterobacteriaceae* in Brazil, Nepal, Morocco, and India. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, p. 7387-7395, 2015.

Cantas, L.; Shah, S. Q.; Cavaco, L. M.; Manaia, C. M.; Walsh, F.; Popowska, M., et al. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. **Front Microbiol**, v. 4, p. 96, 2013.

Canton, R.; Coque, T. M. The CTX-M beta-lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol, v. 9, p. 466-475, 2006.

Canton, R.; Gonzalez-Alba, J. M.; Galan, J. C. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. Front Microbiol, v. 3, p. 110, 2012.

Cao, X.; Zhang, Z.; Shen, H.; Ning, M.; Chen, J.; Wei, H., et al. Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with urinary tract infections. **APMIS**, v. 122, p. 1088-1095, 2014.

Carattoli, A. Plasmids and the spread of resistance. **Int J Med Microbiol**, v. 303, p. 298-304, 2013.

Carattoli, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother, v. 53, p. 2227-2238, 2009.

Carattoli, A.; Bertini, A.; Villa, L.; Falbo, V.; Hopkins, K. L.; Threlfall, E. J. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **J Microbiol Methods**, v. 63, p. 219-228, 2005.

Carattoli, A.; Zankari, E.; Garcia-Fernandez, A.; Voldby Larsen, M.; Lund, O.; Villa, L., et al. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, p. 3895-3903, 2014.

Carvalho-Assef, A. P.; Pereira, P. S.; Albano, R. M.; Beriao, G. C.; Chagas, T. P.; Timm, L. N.; et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. J Antimicrob Chemother, v. 68, p. 2956-2957, 2013.

Carver, T. J.; Rutherford, K. M.; Berriman, M.; Rajandream, M. A.; Barrell, B. G.; Parkhill, J. ACT: the Artemis comparison tool. **Bioinformatics**, v. 21, p. 3422-3423, 2005.

Chapman, P. A.; Ellin, M.; Ashton, R.; Shafique, W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **Int J Food Microbiol**, v. 68, p. 11-20, 2001.

Chelius, M. K.; Triplett, E. W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. Appl Environ Microbiol, v. 66, p. 783-787, 2000.

Chi, F.; Shen, S. H.; Cheng, H. P.; Jing, Y. X.; Yanni, Y. G.; Dazzo, F. B. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, p. 7271-7278, 2005.

Chigor, V. N.; Umoh, V. J.; Smith, S. I. Occurrence of *Escherichia coli* O157 in a river used for fresh produce irrigation in Nigeria. Afr J Biotechnol, v. 9, p. 178-182, 2010.

Choi, K. H.; Mima, T.; Casart, Y.; Rholl, D.; Kumar, A.; Beacham, I. R., et al. Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, p. 1064-1075, 2008.

Chong, Y.; Shimoda, S.; Shimono, N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Infect Genet Evol**, v. 61, p. 185-188, 2018.

Chow, J. W.; Fine, M. J.; Shlaes, D. M.; Quinn, J. P.; Hooper, D. C.; Johnson, M. P., et al. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. **Ann Intern Med**, v. 115, p. 585-590, 1991.

Clermont, O.; Christenson, J. K.; Denamur, E.; Gordon, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environ Microbiol Rep**, v. 5, p. 58-65, 2013.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 29^a ed. Suplemento M100, Wayne, PA, 296 p., 2019.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 5^{a} ed. Norma VET01, Wayne, PA, 156 p., 2018.

Coil, D.; Jospin, G.; Darling, A. E. A5-miseq: An updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina Miseq data. **Bioinformatics**, v. 31, p. 587-589, 2015.

Compant, S.; Kaplan, H.; Sessitsch, A.; Nowak, J.; Ait Barka, E.; Clement, C. Endophytic colonization of *Litis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: From the rhizosphere to inflorescence tissues. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 63, p. 84-93, 2008.

Coque, T. M.; Oliver, A.; Perez-Diaz, J. C.; Baquero, F.; Canton, R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). Antimicrob Agents Chemother, v. 46, p. 500-510, 2002.

Cormican, M. G.; Marshall, S. A.; Jones, R. N. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains by the *Etest* ESBL screen. **J Clin Microbiol**, v. 34, p. 1880-1884, 1996.

Costa, L. E. O.; Queiroz, M. V.; Borges, A. C.; Moraes, C. A.; Araujo, E. F. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Braz J Microbiol**, v. 43, p. 1562-1575, 2012.

D'Andrea, M. M.; Literacka, E.; Zioga, A.; Giani, T.; Baraniak, A.; Fiett, J.; et al. Evolution and spread of a multidrug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases in Europe. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, p. 2735-2742, 2011.

Delbeke, S.; Ceuppens, S.; Hessel, C. T.; Castro, I.; Jacxsens, L.; De Zutter, L., et al. Microbial safety and sanitary quality of strawberry primary production in Belgium: risk factors for *Salmonella* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* contamination. Appl Environ Microbiol, v. 81, p. 2562-2570, 2015.

Dhanji, H.; Patel, R.; Wall, R.; Doumith, M.; Patel, B.; Hope, R., et al. Variation in the genetic environments of *bla*_{CTX-M-15} in *Escherichia coli* from the faeces of travellers returning to the United Kingdom. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, p. 1005-1012, 2011.

Diab, M.; Hamze, M.; Bonnet, R.; Saras, E.; Madec, J. Y.; Haenni, M. OXA-48 and CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamases in raw milk in Lebanon: epidemic spread of dominant *Klebsiella pneumoniae* clones. **J Med Microbiol**, v. 66, p. 1688-1691, 2017.

Doyle, M. P.; Erickson, M. C. Summer meeting 2007 - The problems with fresh produce: an overview. **J Appl Microbiol**, v. 105, p. 317-330, 2008.

Dropa, M.; Lincopan, N.; Balsalobre, L. C.; Oliveira, D. E.; Moura, R. A.; Fernandes, M. R., et al. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 23, p. 4953-4958, 2016.

Dublan Mde, L.; Ortiz-Marquez, J. C.; Lett, L.; Curatti, L. Plant-adapted *Escherichia coli* show increased lettuce colonizing ability, resistance to oxidative stress and chemotactic response. **PLoS One**, v. 9, p. e110416, 2014.

Eckert, C.; Gautier, V.; Saladin-Allard, M.; Hidri, N.; Verdet, C.; Ould-Hocine, Z., et al. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, p. 1249-1255, 2004.

Egorova, S.; Timinouni, M.; Demartin, M.; Granier, S. A.; Whichard, J. M.; Sangal, V., et al. Ceftriaxone-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport, France. **Emerg Infect Dis**, v. 14, p. 954-957, 2008.

El Salabi, A.; Walsh, T. R.; Chouchani, C. Extended spectrum beta-lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. **Crit Rev Microbiol**, v. 39, p. 113-122, 2013.

Empel, J.; Hrabak, J.; Kozinska, A.; Bergerova, T.; Urbaskova, P.; Kern-Zdanowicz, I.; et al. DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in the Czech Republic. **Microb Drug Resist**, v. 16, p. 291-295, 2010.

Eni, A. O.; Oluwawemitan, I. A.; Solomon, O. U. Microbial quality of fruits and vegetables sold in Sango Ota, Nigeria. **Afr J Food Sci**, v. 4, p. 291-296. 2010.

Erickson, M. C.; Webb, C. C.; Diaz-Perez, J. C.; Phatak, S. C.; Silvoy, J. J.; Davey, L.; et al. Infrequent internalization of *Escherichia coli* O157:H7 into field-grown leafy greens. **J Food Prot**, v. 73, p. 500-506, 2010.

Etminani, F.; Harighi, B. Isolation and identification of endophytic bacteria with plant growth promoting activity and biocontrol potential from wild pistachio trees. **Plant Pathol J**, v. 34, p. 208-217, 2018.

Fang, L.; Li, X.; Li, L.; Li, S.; Liao, X.; Sun, J., et al. Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals. **Sci Rep**, v. 6, p. 25312, 2016.

Fernandes, M. R.; Moura, Q.; Sartori, L.; Silva, K. C.; Cunha, M. P.; Esposito, F.; et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. **Euro Surveill**, v. 21, p. 30214, 2016.

Forsberg, K. J.; Reyes, A.; Wang, B.; Selleck, E. M.; Sommer, M. O.; Dantas, G. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. **Science**, v. 337, p. 1107-1111, 2012.

Fouts, D. E.; Tyler, H. L.; DeBoy, R. T.; Daugherty, S.; Ren, Q.; Badger, J. H., et al. Complete genome sequence of the N2-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. **PLoS Genet**, v. 4, p. e1000141, 2008.

Freire, M. P.; de Oliveira Garcia, D.; Cury, A. P.; Spadao, F.; Di Gioia, T. S.; Francisco, G. R.; et al. Outbreak of IMP-producing carbapenem-resistant *Enterobacter gergoviae* among kidney transplant recipients. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, p. 2577-2585, 2016.

Furlan, J. P. R.; Pitondo-Silva, A.; Stehling, E. G. Detection of bla_{NDM-1} in *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Brazilian soil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, p. e170558, 2018a.

Furlan, J. P. R.; Pitondo-Silva, A.; Stehling, E. G. New STs in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harbouring β -lactamases encoding genes isolated from Brazilian soils. **J Appl Microbiol**, v. 125, p. 506-512, 2018b.

Furlan, J. P. R.; Sanchez, D. G.; Fachin, A. L.; Stehling, E. G. Presence of β -lactamase encoding genes in *Burkholderia cepacia* complex isolated from soil. **Microb Drug Resist**, v. 24, p. 347-352, 2018c.

Furlan, J. P. R.; Sanchez, D. G.; Gallo, I. F. L.; Stehling, E. G. Characterization of acquired antimicrobial resistance genes in environmental *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 25, p. 475-479, 2018d.

Furlan, J. P. R.; Stehling, E. G. Detection of *bla*_{PER} on an IncA/C plasmid in *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Brazilian soil. **Water Air Soil Pollut**, v. 229, p. 142, 2018.

Furlan, J. P. R.; Stehling, E. G. Draft genome sequence of a multidrug-resistant tetA/IncF-harbouring *Escherichia coli* ST906 obtained from a soil cultivated with jaboticaba (*Plinia cauliflora*). J Glob Antimicrob Resis, v. 16, p. 181-182, 2019.

Furlan, J. P. R.; Stehling, E. G. Presence of β -lactamases encoding genes in soil samples from different origins. **Water Air Soil Pollut**, v. 228, p. 125, 2017.

Gales, A. C.; Castanheira, M.; Jones, R. N.; Sader, H. S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: Results from SENTRY antimicrobial surveillance program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 73, p. 354-360, 2012.

Galetti, R.; Andrade, L. N.; Varani, A. M.; Darini, A. L. C. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 carries chromosomal pack of acquired resistance genes: an example of high-risk clone associated to "intrinsic resistome". J Glob Antimicrob Resist, doi: 10.1016/j.jgar.2018.12.009, 2018.

Gaspar, E. B.; Neves, P. R.; Levy, C. E.; Mamizuka, E. M.; Lincopan, N. Genetic heterogeneity of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates co-infecting the cerebrospinal fluid of a pediatric patient. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 70, p. 568-570, 2011.

Geser, N.; Stephan, R.; Hachler, H. Occurrence and characteristics of extendedspectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. **BMC Vet Res**, v. 8, p. 21, 2012.

Ghafourian, S.; Sadeghifard, N.; Soheili, S.; Sekawi, Z. Extended spectrum β -lactamases: Definition, classification and epidemiology. **Curr Issues Mol Biol**, v. 17, p. 11-21, 2015.

Gil, M. I.; Selma, M. V.; Suslow, T.; Jacxsens, L.; Uyttendaele, M.; Allende, A. Pre- and postharvest preventive measures and intervention strategies to control microbial

food safety hazards of fresh leafy vegetables. Crit Rev Food Sci Nutr, v. 55, p. 453-468, 2015.

Gimeno-Garcia, E.; Andreu, V.; Boluda, R. Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. **Environ Pollut**, v. 92, p. 19-25, 1996.

Gomes, C.; Da Silva, P.; Moreira, R. G.; Castell-Perez, E.; Ellis, E. A.; Pendleton, M. Understanding *E. coli* internalization in lettuce leaves for optimization of irradiation treatment. **Int J Food Microbiol**, v. 135, p. 238-247, 2009.

Gonçalves, L. F.; de Oliveira Martins-Junior, P.; de Melo, A. B. F.; da Silva, R.; de Paulo Martins, V.; Pitondo-Silva, A., et al. Multidrug resistance dissemination by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in the Central-Western region, Brazil. J Glob Antimicrob Resist, v. 6, p. 1-4, 2016.

Greig, J. D.; Ravel, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **Int J Food Microbiol**, v. 130, p. 77-87, 2009.

Guiral, E.; Mendez-Arancibia, E.; Soto, S. M.; Salvador, P.; Fabrega, A.; Gascon, J., et al. CTX-M-15-producing enteroaggregative *Escherichia coli* as cause of travelers' diarrhea. **Emerg Infect Dis**, v. 17, p. 1950-1953, 2011.

Guo, S.; Wakeham, D.; Brouwers, H. J.; Cobbold, R. N.; Abraham, S.; Mollinger, J. L., et al. Human-associated fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clonal lineages, including ST354, isolated from canine feces and extraintestinal infections in Australia. **Microbes Infect**, v. 17, p. 266-274, 2015.

Guo, X.; Chen, J.; Brackett, R. E.; Beuchat, L. R. Survival of *Salmonella* on tomatoes stored at high relative humidity, in soil, and on tomatoes in contact with soil. **J Food Prot**, v. 65, p. 274-279, 2002.

Guzmán-Blanco, M.; Labarca, J. A.; Villegas, M. V.; Gotuzzo, E. Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial *Enterobacteriaceae* in Latin America. **Braz J Infect Dis**, v. 18, p. 421-433, 2014.

Haley, B. J.; Cole, D. J.; Lipp, E. K. Distribution, diversity, and seasonality of waterborne salmonellae in a rural watershed. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, p. 1248-1255, 2009.

Hall, A. R.; Angst, D. C.; Schiessl, K. T.; Ackermann, M. Costs of antibiotic resistance - separating trait effects and selective effects. **Evol Appl**, v. 8, p. 261-272, 2015.

Hallmann, J.; Quadthallmann, A.; Mahaffee, W. F.; Kloepper, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can J Microbiol**, v. 43, p. 895-914, 1997.

Han, X. M.; Hu, H. W.; Shi, X. Z.; Wang, J. T.; Han, L. L.; Chen, D.; et al. Impacts of reclaimed water irrigation on soil antibiotic resistome in urban parks of Victoria, Australia. **Environ Pollut**, v. 211, p. 48-57, 2016.

Hardoim, P. R.; van Overbeek, L. S.; Berg, G.; Pirttila, A. M.; Compant, S.; Campisano, A., et al. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 79, p. 293-320, 2015.

Hardoim, P. R.; van Overbeek, L. S.; Elsas, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends Microbiol**, v. 16, p. 463-471, 2008.

Harris, L. J.; Farber, J. N.; Beuchat, L. R.; Parish, M. E.; Suslow, T. V.; Garrett, E. H.; et al. Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. **Comp Rev Food Sci Food Saf**, v. 2 (Supplement), p. 78-141, 2003.

Harris, P. N.; Tambyah, P. A.; Paterson, D. L. β -lactam and β -lactamase inhibitor combinations in the treatment of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae*: time for a reappraisal in the era of few antibiotic options? **Lancet Infect Dis**, v. 15, p. 475-485, 2015.

Hartmann, A.; Locatelli, A.; Amoureux, L.; Depret, G.; Jolivet, C.; Gueneau, E., et al. Occurrence of CTX-M producing *Escherichia coli* in soils, cattle, and farm environment in France (Burgundy region). **Front Microbiol**, v. 3, p. 83, 2012.

Hasan, B.; Laurell, K.; Rakib, M. M.; Ahlstedt, E.; Hernandez, J.; Caceres, M., et al. Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamases in healthy humans, poultry, and wild birds in León, Nicaragua - A shared pool of bla_{CTX-M} genes and possible interspecies clonal spread of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli*. **Microb Drug Resist**, v. 22, p. 682-687, 2016.

Hasman, H.; Mevius, D.; Veldman, K.; Olesen, I.; Aarestrup, F. M. β -lactamases among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, p. 115-121, 2005.

Hawkey, P. M.; Jones, A. M. The changing epidemiology of resistance. **J** Antimicrob Chemother, v. 64, p. i3-10, 2009.

Hemlata, H.; Jan, A. T.; Tiwari, A. The ever changing face of antibiotic resistance: Prevailing problems and preventive measures. **Curr Drug Metab**, v. p., 2016.

Henriques, I.; Tacao, M.; Leite, L.; Fidalgo, C.; Araujo, S.; Oliveira, C., et al. Coselection of antibiotic and metal(loid) resistance in gram-negative epiphytic bacteria from contaminated salt marshes. **Mar Pollut Bull**, v. 109, p. 427-434, 2016.

Himathongkham, S.; Bahari, S.; Riemann, H.; Cliver, D. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and cow manure slurry. **FEMS Microbiol Lett**, v. 178, p. 251-257, 1999.

Holley, R. A.; Arrus, K. M.; Ominski, K. H.; Tenuta, M.; Blank, G. Salmonella survival in manure-treated soils during simulated seasonal temperature exposure. **J Environ Qual**, v. 35, p. 1170-1180, 2006.

Hölzel, C. S.; Tetens, J. L.; Schwaiger, K. Unraveling the role of vegetables in spreading antimicrobial-resistant bacteria: a need for quantitative risk assessment. **Foodborne Pathog Dis**, v. 15, p. 671-688, 2018.

Hong, J.; Kim, Y.; Kim, J.; Heu, S.; Kim, S. R.; Kim, K. P.; et al. Genetic diversity and antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from leaf vegetables in Korea. **J Food Sci**, v. 80, p. M1526-1531, 2015.

Hosoglu, S.; Gundes, S.; Kolayli, F.; Karadenizli, A.; Demirdag, K.; Gunaydin, M., et al. Extended-spectrum beta-lactamases in ceftazidime-resistant Escherichia coli and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Turkish hospitals. **Indian J Med Microbiol**, v. 25, p. 346-350, 2007.

Huang, J. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. **Annu Rev Phytopathol**, v. 24, p. 141-157, 1986.

Humeniuk, C.; Arlet, G.; Gautier, V.; Grimont, P.; Labia, R.; Philippon, A. Betalactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, p. 3045-3049, 2002.

Inceoglu, O.; Salles, J. F.; Van Overbeek, L.; Van Elsas, J. D. Effects of plant genotype and growth stage on the betaproteobacterial communities associated with different potato cultivars in two fields. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, p. 3675-3684, 2010.

Iniguez, A. L.; Dong, Y.; Triplett, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 17, p. 1078-1085, 2004.

Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, p. 23-28, 1990.

Jacoby, G. A. AmpC beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, p. 161-182, Table of Contents, 2009.

Jarlier, V.; Nicolas, M. H.; Fournier, G.; Philippon, A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev Infect Dis**, v. 10, p. 867-878, 1988.

Joensen, K. G.; Scheutz, F.; Lund, O.; Hasman, H.; Kaas, R. S.; Nielsen, E. M., et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v. 52, p. 1501-1510, 2014.

Joensen, K. G.; Tetzschner, A. M.; Iguchi, A.; Aarestrup, F. M.; Scheutz, F. Rapid and easy *in silico* serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. **J Clin Microbiol**, v. 53, p. 2410-2426, 2015.

Jones, P.; Binns, D.; Chang, H. Y.; Fraser, M.; Li, W.; McAnulla, C.; et al. Interproscan 5: Genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, v. 30, p. 1236-1240, 2014.

Jones, R. N.; Kirby, J. T.; Rhomberg, P. R. Comparative activity of meropenem in US medical centers (2007): initiating the 2nd decade of MYSTIC program surveillance. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 61, p. 203-213, 2008.

Jones-Dias, D.; Manageiro, V.; Ferreira, E.; Barreiro, P.; Vieira, L.; Moura, I. B.; et al. Architecture of class 1, 2, and 3 integrons from Gram-negative bacteria recovered among fruits and vegetables. **Front Microbiol**, v. 7, p. 1400, 2016.

Kananke, T.; Wansapala, J.; Gunaratne A. Heavy metal contamination in green leafy vegetables collected from selected market sites of Piliyandala area, Colombo District, Sri Lanka. **Am J Food Sci Technol**, v. 2, p. 139-144, 2014.

Kandel, S. L.; Joubert, P. M; Doty, S. L. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. **Microorganisms**, v. 5, pii. E77, 2017.

Kang, S. A.; Han, J. W.; Kim, B. S. Community structures and antagonistic activities of the bacteria associated with surface-sterilized pepper plants grown in different field soils. **Arch Microbiol**, v. 198, p. 1027-1034, 2016.

Karim, A.; Poirel, L.; Nagarajan, S.; Nordmann, P. Plasmid-mediated extendedspectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence IS*Ecp1*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 201, p. 237-241, 2001. Kaye, K. S.; Cosgrove, S.; Harris, A.; Eliopoulos, G. M.; Carmeli, Y. Risk factors for emergence of resistance to broad-spectrum cephalosporins among *Enterobacter* spp. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 2628-2630, 2001.

Kiiru, J.; Butaye, P.; Goddeeris, B. M.; Kariuki, S. Analysis for prevalence and physical linkages amongst integrons, ISE*cp1*, IS*CR1*, Tn21 and Tn7 encountered in *Escherichia coli* strains from hospitalized and non-hospitalized patients in Kenya during a 19-year period (1992-2011). **BMC Microbiol**, v. 13, p. 109, 2013.

Kim, M. C.; Cha, M. H.; Ryu, J. G.; Woo, G. J. Characterization of vancomycinresistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from fresh produces and human fecal samples. **Foodborne Pathog Dis**, v. 14, p. 195-201, 2017.

Kliebe, C.; Nies, B. A.; Meyer, J. F.; Tolxdorff-Neutzling, R. M.; Wiedemann, B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 28, p. 302-307, 1985.

Kobayashi, D. Y.; Reedy, R. M.; Bick, J.; Oudemans, P. V. Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, p. 1047-1054, 2002.

Koraimann, G.; Wagner, M. A. Social behavior and decision making in bacterial conjugation. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 4, p. 54, 2014.

Kraiser, T.; Gras, D. E.; Gutierrez, A. G.; Gonzalez, B.; Gutierrez, R. A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **J Exp Bot**, v. 62, p. 1455-1466, 2011.

Kryuchkova, Y. V.; Burygin, G. L.; Gogoleva, N. E.; Gogolev, Y. V.; Chernyshova, M. P.; Makarov, O. E., et al. Isolation and characterization of a glyphosatedegrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. **Microbiol Res**, v. 169, p. 99-105, 2014.

Lamb, T. G.; Tonkyn, D. W.; Kluepfel, D. A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Can J Microbiol**, v. 42, p. 1112-1120, 1996.

Lang, N. L.; Smith, S. R. Influence of soil type, moisture content and biosolids application on the fate of *Escherichia coli* in agricultural soil under controlled laboratory conditions. **J Appl Microbiol**, v. 103, p. 2122-2131, 2007.

Lartigue, M. F.; Poirel, L.; Nordmann, P. Diversity of genetic environment of *bla*_{CTX-M} genes. **FEMS Microbiol Lett**, v. 234, p. 201-207, 2004.

Lautenbach, E.; Metlay, J. P.; Mao, X.; Han, X.; Fishman, N. O.; Bilker, W. B., et al. The prevalence of fluoroquinolone resistance mechanisms in colonizing *Escherichia coli* isolates recovered from hospitalized patients. **Clin Infect Dis**, v. 51, p. 280-285, 2010.

Lee, K.; Chong, Y.; Shin, H. B.; Kim, Y. A.; Yong, D.; Yum, J. H. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clin Microbiol Infect**, v. 7, p. 88-91, 2001.

Leverstein-Van Hall, M. A.; Dierikx, C. M.; Cohen Stuart, J.; Voets, G. M.; Van Den Munckhof, M. P.; Van Essen-Zandbergen, A., et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, p. 873-880, 2011.

Levin, A. S.; Oliveira, M. S. The challenge of multidrug resistance: the treatment of gram-negative rod infections. **Shock**, v. 30 (Supplement 1), p. 30-33, 2008.

Levy, D. J.; Beck, N. K.; Kossik, A. L.; Patti, T.; Meschke, J. S.; Calicchia, M., et al. Microbial safety and quality of fresh herbs from Los Angeles, Orange County and Seattle farmers' markets. **J Sci Food Agric**, v. 95, p. 2641-3645, 2015.

Li, C.; Li, Y.; Zhao, Z.; Liu, Q.; Li, B. Treatment options and clinical outcomes for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* bloodstream infection in a Chinese university hospital. **J Infect Public Health**, v. 12, p. 26-31, 2019.

Li, J.; Tai, C.; Deng, Z.; Zhong, W.; He, Y.; Ou, H. Y. VRprofile: gene-clusterdetection-based profiling of virulence and antibiotic resistance traits encoded within genome sequences of pathogenic bacteria. **Brief Bioinform**, v. 19. p. 566-574, 2017.

Lian, J.; Wang, Z.; Zhou, S. Response of endophytic bacterial communities in banana tissue culture plantlets to *Fusarium* wilt pathogen infection. J Gen Appl Microbiol, v. 54, p. 83-92, 2008.

Lin, J. T.; Stewart, V. Nitrate assimilation by bacteria. Adv Microb Physiol, v. 39, p. 1-30, 379, 1998.

Liu, S.; Hu, X.; Lohrke, S. M.; Baker, C. J.; Buyer, J. S.; de Souza, J. T., et al. Role of *sdha* and *pfka* and catabolism of reduced carbon during colonization of cucumber roots by *Enterobacter cloacae*. **Microbiology**, v. 153, p. 3196-3209, 2007.

Liu, W.; Wang, Q.; Hou, J.; Tu, C.; Luo, Y.; Christie, P. Whole genome analysis of halotolerant and alkalotolerant plant growth-promoting rhizobacterium *Klebsiella* sp. D5A. **Sci Rep**, v. 6, p. 26710, 2016.

Liu, W.; Yuan, J. S.; Stewart, C. N., Jr. Advanced genetic tools for plant biotechnology. Nat Rev Genet, v. 14, p. 781-793, 2013.

Liu, Y. Y.; Wang, Y.; Walsh, T. R.; Yi, L. X.; Zhang, R.; Spencer, J., et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis, v. 16, p. 161-168, 2016.

Liu, Y.; Liu, J. H. Monitoring colistin resistance in food animals, an urgent threat. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 16, p. 443-446, 2018.

Livermore, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev, v. 8, p. 557-584, 1995.

Livermore, D. M.; Canton, R.; Gniadkowski, M.; Nordmann, P.; Rossolini, G. M.; Arlet, G.; et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. J Antimicrob Chemother, v. 59, p. 165-174, 2007.

Livermore, D. M.; Woodford, N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends Microbiol**, v. 14, p. 413-420, 2006.

Lopes, A. C.; Veras, D. L.; Lima, A. M.; Melo Rde, C.; Ayala, J. $bla_{CTX-M-2}$ and $bla_{CTX-M-28}$ extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 163-167, 2010.

Lopes, R. B.; Costa, L. E.; Vanetti, M. C.; de Araujo, E. F.; de Queiroz, M. V. Endophytic bacteria isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris*) exhibiting high variability showed antimicrobial activity and quorum sensing inhibition. **Curr Microbiol**, v. 71, p. 509-516, 2015.

Lopes, R.; Cerdeira, L. T.; Fernandes, M. R.; Perez-Chaparro, P. J.; McCulloch, J. A.; Lincopan, N. Draft genome sequence of a CTX-M-15-producing endophytic *Klebsiella pneumoniae* ST198 isolate from commercial lettuce. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 10, p. 19-20, 2017a.

Lopes, R.; Cerdeira, L.; Tavares, G. S.; Ruiz, J. C.; Blom, J.; Horacio, E. C. A.; et al. Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogens. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 33, p. 185, 2017b.

Lopes, R.; Tsui, S.; Goncalves, P.; de Queiroz, M. V. A look into a multifunctional toolbox: Endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 34, p. 94, 2018.

Lu, S. Y.; Zhang, Y. L.; Geng, S. N.; Li, T. Y.; Ye, Z. M.; Zhang, D. S., et al. High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, p. 5972-5976, 2010.

Lye, D. C.; Earnest, A.; Ling, M. L.; Lee, T. E.; Yong, H. C.; Fisher, D. A.; et al. The impact of multidrug resistance in healthcare-associated and nosocomial Gramnegative bacteraemia on mortality and length of stay: cohort study. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, p. 502-508, 2012.

Lynch, M. F.; Tauxe, R. V.; Hedberg, C. W. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. **Epidemiol Infect**, v. 137, p. 307-315, 2009.

Machuca, J.; Lopez-Cerero, L.; Fernandez-Cuenca, F.; Mora-Navas, L.; Mediavilla-Gradolph, C.; Lopez-Rodriguez, I.; et al. OXA-48-like-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Spain in 2014-2015. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 63, p. e01396-18, 2019.

Magiorakos, A. P.; Srinivasan, A.; Carey, R. B.; Carmeli, Y.; Falagas, M. E.; Giske, C. G., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, p. 268-281, 2012.

Mantzoukas, S.; Lagogiannis, I. Endophytic colonization of pepper (*Capsicum annum*) controls aphids (*Myzus persicae* Sulzer). Appl Sci, v. 9, p. 2239, 2019.

Marchaim, D.; Navon-Venezia, S.; Schwaber, M. J.; Carmeli, Y. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p. 1413-1418, 2008.

Marder, E. P.; Garman, K. N.; Ingram, L. A.; Dunn, J. R. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bagged salad. **Foodborne Pathog Dis**, v. 11, p. 593-595, 2014.

Mathers, A. J.; Peirano, G.; Pitout, J. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Clin Microbiol Rev**, v. 28, p. 565-591, 2015.

Mengoni, A.; Maida, I.; Chiellini, C.; Emiliani, G.; Mocali, S.; Fabiani, A., et al. Antibiotic resistance differentiates *Echinacea purpurea* endophytic bacterial communities with respect to plant organs. **Res Microbiol**, v. 165, p. 686-694, 2014.

Michino, H.; Araki, K.; Minami, S.; Takaya, S.; Sakai, N.; Miyazaki, M., et al. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. **Am J Epidemiol**, v. 150, p. 787-796, 1999.

Minarini, L. A.; Gales, A. C.; Palazzo, I. C.; Darini, A. L. Prevalence of community-occurring extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Curr Microbiol**, v. 54, p. 335-341, 2007.

Minarini, L. A.; Poirel, L.; Trevisani, N. A.; Darini, A. L.; Nordmann, P. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 65, p. 202-206, 2009.

Mirakian, R.; Leech, S. C.; Krishna, M. T.; Richter, A. G.; Huber, P. A.; Farooque, S., et al. Management of allergy to penicillins and other beta-lactams. **Clin Exp Allergy**, v. 45, p. 300-327, 2015.

Mody, R. K.; Greene, S. A.; Gaul, L.; Sever, A.; Pichette, S.; Zambrana, I., et al. National outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections: importance of Texas restaurant investigations in implicating jalapeno peppers. **Plos One**, v. 6, p. e16579, 2011.

Mogren, L.; Windstam, S.; Boqvist, S.; Vagsholm, I.; Soderqvist, K.; Rosberg, A. K.; et al. The hurdle approach - A holistic concept for controlling food safety risks associated with pathogenic bacterial contamination of leafy green vegetables. A review. **Front Microbiol**, v. 9, p. 1965, 2018.

Moreno, L. Z.; Gomes, V. T. M.; Moreira, J.; de Oliveira, C. H.; Peres, B. P.; Silva, A. P. S.; et al. First report of *mcr-1*-harboring *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolated from poultry meat in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.016, 2018.

Müller, A.; Stephan, R.; Nuesch-Inderbinen, M. Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. **Sci Total Environ**, v. 541, p. 667-672, 2016.

Muzaheed; Doi, Y.; Adams-Haduch, J. M.; Endimiani, A.; Sidjabat, H. E.; Gaddad, S. M., et al. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* among inpatients and outpatients with urinary tract infection in Southern India. **J Antimicrob Chemother**, v. 61, p. 1393-1394, 2008.

M'Zali, F. H.; Heritage, J.; Gascoyne-Binzi, D. M.; Denton, M.; Todd, N. J.; Hawkey, PM. Transcontinental importation into the UK of *Escherichia coli* expressing a plasmid-mediated AmpC-type β -lactamase exposed during an outbreak of SHV-5 extended-spectrum fl-lactamase in a Leeds hospital. **J Antimicrob Chemother**, v. 40, p. 823-831, 1997.

Naas, T.; Mikami, Y.; Imai, T.; Poirel, L.; Nordmann, P. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. **J Bacteriol**, v. 183, p. 235-249, 2001.

Naas, T.; Poirel, L.; Nordmann, P. Minor extended-spectrum β -lactamases. Clin Microbiol Infect, v. 14, p. 42-52, 2008.

Najafi, M. B. H.; Khodaparast, M. H. H. Efficacy of ozone to reduce microbial populations in date fruits. **Food Control**, v. 20, p. 27-30, 2009.

Nascimento, T.; Cantamessa, R.; Melo, L.; Fernandes, M. R.; Fraga, E.; Dropa, M., et al. International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban lake waters. **Sci Total Environ**, v. 598, p. 910-915, 2017.

Neal, J. A.; Marquez-Gonzalez, M.; Cabrera-Diaz, E.; Lucia, L. M.; O'Bryan, C. A.; Crandall, et al. Comparison of multiple chemical sanitizers for reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. **Food Res Int**, v. 45, p. 1123-1128, 2012.

Nesme, J.; Simonet, P. The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. **Environ Microbiol**, v. 17, p. 913-930, 2015.

Niemira, B. A.; Fan, X. Low-dose irradiation of fresh and fresh-cut produce: safety, sensory and shelf life. In: Sommers, C.; Fan, X. (Eds.). **Food Irradiation Research and Technology**. Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists, Ames, p. 169-181, 2005.

Niemira, B. A.; Sites, J. Cold plasma inactivates Salmonella Stanley and *Escherichia coli* O157:H7 inoculated on golden delicious apples. **J Food Prot**, v. 71, p. 1357-1365, 2008.

Njage, P. M. K.; Buys, E. M. Pathogenic and commensal *Escherichia coli* from irrigation water show potential in transmission of extended spectrum and AmpC β -lactamases determinants to isolates from lettuce. **Microb Biotechnol**, v. 8, p. 462-473, 2015.

Nogueira, K. S.; Conte, D.; Maia, F. V.; Dalla-costa, L. M. Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, p. 162-169, 2015.

Ojdana, D.; Sacha, P.; Wieczorek, P.; Czaban, S.; Michalska, A.; Jaworowska, J.; et al. The occurrence of bla_{CTX-M} , bla_{SHV} , and bla_{TEM} genes in extended-spectrum β -lactamase-positive strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland. **Int J Antibiotics**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

Olaimat, A. N.; Holley, R. A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. **Food Microbiol**, v. 32, p. 1-19, 2012.

Oliveira, S.; Moura, R. A.; Silva, K. C.; Pavez, M.; McCulloch, J. A.; Dropa, M., et al. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. **J Antimicrob Chemother**, v. 69, p. 849-852, 2014.

Olmez, H.; Temur, S. D. Effects of different sanitizing treatments on biofilms and attachment of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on green leaf lettuce. **LWT Food Sci Technol**, v. 43, p. 964-970, 2010.

O'Neill J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Disponível em: <u>https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20</u> Paper%20%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of %20nations_1.pdf, 2014. Acesso em: 21 de janeiro de 2019.

Osaili, T. M.; Al Jamali, A. F.; Makhadmeh, I. M.; Taha, M.; Jarrar, S. K. Heavy metals in vegetables sold in the local market in Jordan. Food Addit Contam Part B Surveill, v. 9, p. 223-229, 2016.

Paiva, A. L.; Lincopan, N.; Silva, K. C.; Neves, P. R.; Moreno, A. M.; Mcculloch, J. A., et al. Low-virulence phylogenetic background of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. **J Infect Dev Ctries**, v. 7, p. 756-760, 2013.

Park, Y. J.; Lee, S.; Kim, Y. R.; Oh, E. J.; Woo, G. J.; Lee, K. Occurrence of extended-spectrum (beta)-lactamases and plasmid-mediated AmpC (beta)-lactamases among Korean isolates of *Proteus mirabilis*. J Antimicrob Chemother, v. 57, p. 156-158, 2006.

Pavez, M.; Mamizuka, E. M.; Lincopan, N. Early dissemination of KPC-2producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, p. 2702, 2009.

Pavez, M.; Neves, P.; Dropa, M.; Matte, M. H.; Grinbaum, R. S.; Elmor De Araujo, M. R., et al. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC beta-lactamase in Brazil. **J Med Microbiol**, v. 57, p. 1590-1592, 2008.

Peirano, G.; Ahmed-Bentley, J.; Woodford, N.; Pitout, J. D. New delhi metallo-βlactamase from traveler returning to Canada. **Emerg Infect Dis**, v. 17, p. 242-244, 2011.

Peirano, G.; Seki, L. M.; Val Passos, V. L.; Pinto, M. C.; Guerra, L. R.; Asensi, M. D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, p. 265-268, 2009.

Peng, C.; Zong, Z. Sequence type 38 *Escherichia coli* carrying *bla*_{CTX-M-14}. **J Med Microbiol**, v. 60, p. 694-695, 2011.

Pereira, P. S.; De Araujo, C. F.; Seki, L. M.; Zahner, V.; Carvalho-Assef, A. P.; Asensi, M. D. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). J Antimicrob Chemother, v. 68, p. 312-316, 2013.

Perez-Perez, F. J.; Hanson, N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC betalactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 2153-2162, 2002.

Philippon, A.; Arlet, G.; Jacoby, G. A. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother, v. 46, p. 1-11, 2002.

Picão, R. C.; Cardoso, J. P.; Campana, E. H.; Nicoletti, A. G.; Petrolini, F. V.; Assis, D. M.; et al. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and *Enterobacteriaceae* in sewage. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 76, p. 80-85, 2013.

Pinski, A.; Betekhtin, A.; Hupert-Kocurek, K.; Mur, L. A. J.; Hasterok, R. Defining the genetic basis of plant-endophytic bacteria interactions. **Int J Mol Sci**, v. 20, p., 2019.

Pinto, U. M.; Pappas, K. M.; Winans, S. C. The ABCs of plasmid replication and segregation. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, p. 755-765, 2012.

Pitout, J. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. **Front Microbiol**, v. 3, p. 9, 2012.

Pitout, J. D.; Gregson, D. B.; Poirel, L.; McClure, J. A.; Le, P.; Church, D. L. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-β-lactamases in a large centralized laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 3129-3135, 2005.

Poirel, L.; Walsh, T. R.; Cuvillier, V.; Nordmann, P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 70, p. 119-123, 2011.

Pomerleau, J.; Lock, K.; McKee, M. The burden of cardiovascular disease and cancer attributable to low fruit and vegetable intake in the European Union: differences between old and new member states. **Public Health Nutr**, v. 9, p. 575-583, 2006.

Popowska, M.; Rzeczycka, M.; Miernik, A.; Krawczyk-Balska, A.; Walsh, F.; Duffy, B. Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, p. 1434-1443, 2012.

Queenan, A. M.; Bush, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. Clin Microbiol Rev, v. 20, p. 440-458, 2007.

Randall, L. P.; Cooles, S. W.; Sayers, A. R.; Woodward, M. J. Association between cyclohexane resistance in *Salmonella* of different serovars and increased resistance to multiple antibiotics, disinfectants and dyes. **J Med Microbiol**, v. 50, p. 919-924, 2001.

Rangel, J. M.; Sparling, P. H.; Crowe, C.; Griffin, P. M.; Swerdlow, D. L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. **Emerg Infect Dis**, v. 11, p. 603-609, 2005.

Rangjaroen, C.; Sungthong, R.; Rerkasem, B.; Teaumroong, N.; Noisangiam, R.; Lumyong, S. Untapped endophytic colonization and plant growth-promoting potential of the genus *Novosphingobium* to optimize rice cultivation. **Microbes Environ**, v. 32, p. 84-87, 2017.

Raphael, E.; Wong, L. K.; Riley, L. W. Extended-spectrum beta-lactamase gene sequences in gram-negative saprophytes on retail organic and nonorganic spinach. Appl Environ Microbiol, v. 77, p. 1601-1607, 2011.

Raskin, I. Salicylate, a new plant hormone. Plant Physiol, v. 99, p. 799-803, 1992.

Reuland, E. A.; Al Naiemi, N.; Raadsen, S. A.; Savelkoul, P. H.; Kluytmans, J. A.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. Prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in raw vegetables. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, p. 1843-1846, 2014.

Reyna-Flores, F.; Barrios-Camacho, H.; Dantan-Gonzalez, E.; Ramirez-Trujillo, J. A.; Lozano Aguirre Beltran, L. F.; Rodriguez-Medina, N., et al. Draft genome sequences of endophytic isolates of *Klebsiella variicola* and *Klebsiella pneumoniae* obtained from the same sugarcane plant. **Genome Announc**, v. 6, p. e00147-18, 2018.

Rezaee, M. A.; Sheikhalizadeh, V.; Hasani, A. Detection of integrons among multidrug resistant (MDR) *Escherichia coli* strains isolated from clinical specimens in Northern West of Iran. **Braz J Microbiol**, v. 42, p. 1308-1313, 2011.

Rezende, A. C. B.; de Castro, F. M.; Porto, E.; Uchima, C. A.; Benato, E.; Penteado, A. L. Occurrence of *Salmonella* spp. in persimmon fruit (*Diospyruskaki*) and growth of *Salmonella* Enteritidis on the peel and in the pulp of this fruit. **Food Control**, v. 20, p. 1025-1029, 2009.

Rice, P.; Longden, I.; Bleasby, A. Emboss: the European molecular biology open software suite. **Trends Genet**, v. 16, p. 276-277, 2000.

Rivas-San Vicente, M.; Plasencia, J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. **J Exp Bot**, v. 62, p. 3321-3338, 2011.

Rocha, F. R.; Pinto, V. P.; Barbosa, F. C. The spread of ctx-m-type extended-spectrum β -lactamases in Brazil: A systematic review. **Microb Drug Resist**, v. 22, p. 301-311, 2016.

Rocha, P.; Azab, E.; Schmidt, B.; Storch, V.; Hollert, H.; Braunbeck, T. Changes in toxicity and dioxin-like activity of sediments from the Tiete River (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 73, p. 550-558, 2010.

Rodgers, S. L.; Cash, J. N.; Siddiq, M.; Ryser, E. T. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. **J Food Prot**, v. 67, p. 721-731, 2004.

Rodríguez-Baño, J.; Gutierrez-Gutierrez, B.; Machuca, I.; Pascual, A. Treatment of infections caused by extended-spectrum-β-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Clin Microbiol Rev**, v. 31, p., 2018.

Rossi, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clin Infect Dis**, v. 52, p. 1138-1143, 2011.

Saladin, M.; Cao, V. T.; Lambert, T.; Donay, J. L.; Herrmann, J. L.; Ould-Hocine, Z., et al. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiol Lett**, v. 209, p. 161-168, 2002.

Saldaña, Z.; Sanchez, E.; Xicohtencatl-Cortes, J.; Puente, J. L.; Giron, J. A. Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. **Front Microbiol**, v. 2, p. 119, 2011.

Sambrook, J.; Russel, D. W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 3 v., 2100 p., 2001.

Sanchez, D. G.; de Melo, F. M.; Savazzi, E. A.; Stehling, E. G. Detection of different β -lactamases encoding genes, including *bla*_{NDM}, and plasmid-mediated quinolone resistance genes in different water sources from Brazil. **Environ Monit Assess**, v. 190, p. 407, 2018.

Sartori, L.; Fernandes, M. R.; Ienne, S.; de Souza, T. A.; Gregory, L.; Cerdeira, L., et al. Draft genome sequences of two fluoroquinolone-resistant CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST90 (ST23 complex) isolated from a calf and a dairy cow in South America. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 11, p. 145-147, 2017.

Schneiders, T.; Amyes, S. G.; Levy, S. B. Role of AcrR and RamA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p. 2831-2837, 2003.

Schwaber, M. J.; Navon-Venezia, S.; Kaye, K. S.; Ben-Ami, R.; Schwartz, D.; Carmeli, Y. Clinical and economic impact of bacteremia with extended- spectrum-betalactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 1257-1262, 2006.

Schwaiger, K.; Helmke, K.; Holzel, C. S.; Bauer, J. Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). **Int J Food Microbiol**, v. 148, p. 191-196, 2011.

Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, p. 2068-2069, 2014.

Sen, S; Sarkar, K. Screening for ESBL producing bacterial isolates of agricultural soil and profiling for multidrug resistance. **Ann Agrar Sci**, v. 16, p. 272-280, 2018.

Seow, J.; Ágoston, R.; Phua, L.; Yuk, H.G. Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. **Food Control**, v. 25, p. 39-44, 2012.

Shaban, N. S.; Abdou, K. A.; Hassan, N. E. H. Impact of toxic heavy metals and pesticide residues in herbal product. **Beni-Seuf Univ J Appl Sci**, v. 5, p. 102-106, 2016.

Shankar, M.; Ponraj, P.; Ilakkiam, D.; Gunasekaran, P. Root colonization of a rice growth promoting strain of *Enterobacter cloacae*. **J Basic Microbiol**, v. 51, p. 523-530, 2011.

Shim, W. B.; Je, G. S.; Kim, K.; Mtenga, A. B.; Lee, W. G.; Song, J. U.; Chung, D. H.; Yoon, Y. Effect of irradiation on kinetic behavior of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in lettuce and damage of bacterial cell envelope. **Radiat Phys Chem**, v. 81, p. 566-571, 2012.

Sidjabat, H. E.; Seah, K. Y.; Coleman, L.; Sartor, A.; Derrington, P.; Heney, C.; et al. Expansive spread of IncI1 plasmids carrying *bla*_{CMY-2} amongst *Escherichia coli*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 44, p. 203-208, 2014.

Siguier, P.; Perochon, J.; Lestrade, L.; Mahillon, J.; Chandler, M. ISfinder: The reference centre for bacterial insertion sequences. **Nucleic Acids Res**, v. 34, p. D32-36, 2006.

Silva, K. C.; Lincopan, N. Epidemiologia das β -lactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações no agronegócio. **J Bras Patol Med Lab**, v. 2, p. 91-99, 2012.

Silva, K. C.; Moreno, M.; Cabrera, C.; Spira, B.; Cerdeira, L.; Lincopan, N., et al. First characterization of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strains belonging to sequence type (ST) 410, ST224, and ST1284 from commercial swine in South America. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, p. 2505-2508, 2016.

Sipter, E.; Rozsa, E.; Gruiz, K.; Tatrai, E.; Morvai, V. Site-specific risk assessment in contaminated vegetable gardens. **Chemosphere**, v. 71, p. 1301-1307, 2008.

Sivapalasingam, S.; Friedman, C. R.; Cohen, L.; Tauxe, R. V. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. **J Food Prot**, v. 67, p. 2342-2353, 2004.

Starkey, M.; Rahme, L. G. Modeling *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis in plant hosts. **Nat Protoc**, v. 4, p. 117-124, 2009.

Stoesser, N.; Sheppard, A. E.; Moore, C. E.; Golubchik, T.; Parry, C. M.; Nget, P., et al. Extensive within-host diversity in fecally carried extended-spectrum-beta-lactamaseproducing *Escherichia coli* isolates: Implications for transmission analyses. J Clin Microbiol, v. 53, p. 2122-2131, 2015.

Suzuki, S.; Shibata, N.; Yamane, K.; Wachino, J.; Ito, K.; Arakawa, Y. Change in the prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, p. 72-79, 2009.

Sy, K. V.; Murray, M. B.; Harrison, M. D.; Beuchat, L. R. Evaluation of gaseous chlorine dioxide as a sanitizer for killing *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and yeasts and molds on fresh and fresh-cut produce. **J Food Prot**, v. 68, p. 1176-1187, 2005.

Syranidou, E.; Thijs, S.; Avramidou, M.; Weyens, N.; Venieri, D.; Pintelon, I., et al. Responses of the endophytic bacterial communities of *Juncus acutus* to pollution with

metals, emerging organic pollutants and to bioaugmentation with indigenous strains. **Front Plant Sci**, v. 9, p. 1526, 2018.

Tan, T. Y.; Ng, L. S.; He, J.; Koh, T. H.; Hsu, L. Y. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother, v. 53, p. 146-149, 2009.

Tanuja, R.; Bisht, S. C.; Mishra, P. K. Ascending migration of endophytic *Bacillus thuringiensis* and assessment of benefits to different legumes of N.W. Himalayas. **Eur J** Soil Biol, v. 56, p. 56-64, 2013.

Teplitski, M.; Warriner, K.; Bartz, J.; Schneider, K. R. Untangling metabolic and communication networks: interactions of enterics with phytobacteria and their implications in produce safety. **Trends Microbiol**, v. 19, p. 121-127, 2011.

Thomas, P.; Sekhar, A. C. Live cell imaging reveals extensive intracellular cytoplasmic colonization of banana by normally non-cultivable endophytic bacteria. **AoB Plants**, v. 6, pii: plu002, 2014.

Thomas, P.; Swarna, G. K.; Patil, P.; Rawal, R. D. Ubiquitous presence of normally non-culturable endophytic bacteria in field shoot-tips of banana and their gradual activation to quiescent cultivable form in tissue cultures. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 93, p. 39-54, 2008.

Thomson, K. S.; Sanders, C. C. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, p. 1877-1882, 1992.

Toleman, M. A.; Spencer, J.; Jones, L.; Walsh, T. R. *bla*_{NDM-1} is a chimera likely constructed in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, p. 2773-2776, 2012.

Tolentino, F. M.; Bueno, M. F. C.; Franscisco, G. R.; Barcelos, D. D. P.; Lobo, S. M.; Tomaz, F.; et al. Endemicity of the high-risk clone *Klebsiella pneumoniae* ST340 coproducing QnrB, CTX-M-15, and KPC-2 in a Brazilian hospital. **Microb Drug Resist**, doi: 10.1089/mdr.2018.0006, 2018.

Torres, A. G.; Jeter, C.; Langley, W.; Matthysse, A. G. Differential binding of *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa, human epithelial cells, and plastic is mediated by a variety of surface structures. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, p. 8008-8015, 2005.

Torres, A. G.; Kaper, J. B. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to Hela cells. **Infect Immun**, v. 71, p. 4985-4995, 2003.

Touati, A.; Mairi, A.; Baloul, Y.; Lalaoui, R.; Bakour, S.; Thighilt, L.; et al. First detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 in fresh vegetables from Béjaïa city, Algeria. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 9, p. 17-18, 2017.

Tzouvelekis, L. S.; Markogiannakis, A.; Psichogiou, M.; Tassios, P. T.; Daikos, G. L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, p. 682-707, 2012.

Ur Rahman, S.; Ali, T.; Ali, I.; Khan, N. A.; Han, B.; Gao, J. The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. **Biomed Res Int**, v. 2018, p. 9519718, 2018.

Valentin-Bon, I.; Jacobson, A.; Monday, S. R.; Feng, P. C. Microbiological quality of bagged cut spinach and lettuce mixes. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, p. 1240-1242, 2008.

Van Boeckel, T. P.; Gandra, S.; Ashok, A.; Caudron, Q.; Grenfell, B. T.; Levin, S. A., et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. **Lancet Infect Dis**, v. 14, p. 742-750, 2014.

Van Overbeek, L.; Van Elsas, J. D. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). **FEMS Microbiol Ecol**, v. 64, p. 283-296, 2008.

Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupski, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

Viazis, S.; Akhtar, M.; Feirtag, J.; Diez-Gonzalez, F. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and trans-cinnamaldehyde. **Food Microbiol**, v. 28, p. 149-157, 2011.

Villegas, M. V.; Kattan, J. N.; Quinteros, M. G.; Casellas, J. M. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, p. 154-158, 2008.

Waack, S.; Keller, O.; Asper, R.; Brodag, T.; Damm, C.; Fricke, W. F.; et al. Scorebased prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models. **BMC Bioinformatics**, v. 7, p. 142, 2006.

Wales, A. D.; Davies, R. H. Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. **Antibiotics (Basel)**, v. 4, p. 567-604, 2015.

Walsh, F.; Duffy, B. The culturable soil antibiotic resistome: a community of multidrug resistant bacteria. **PLoS One**, v. 8, p. e65567, 2013.

Wang, B.; Sun, D. Detection of NDM-1 carbapenemase-producing *Acinetobacter* calcoaceticus and *Acinetobacter junii* in environmental samples from livestock farms. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, p. 611-613, 2015.

Wang, J.; Yao, X.; Luo, J.; Lv, L.; Zeng, Z.; Liu, J. H. Emergence of *Escherichia coli* co-producing NDM-1 and KPC-2 carbapenemases from a retail vegetable, China. **J Antimicrob Chemother**, v. 73, p. 252-254, 2018.

Warriner, K.; Huber, A.; Namvar, A.; Fan, W.; Dunfield, K. Recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. **Adv Food Nutr Res**, v. 57, p. 155-208, 2009.

Woerther, P. L.; Burdet, C.; Chachaty, E.; Andremont, A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamases in the community: Toward the globalization of CTX-M. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, p. 744-758, 2013.

Woolhouse, M.; Ward, M.; Van Bunnik, B.; Farrar, J. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 370, p. 20140083, 2015.

Yagi, T.; Wachino, J.; Kurokawa, H.; Suzuki, S.; Yamane, K.; Doi, Y., et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C betalactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 2551-2558, 2005.

Yum, J. H.; Kim, S.; Lee, H.; Yong, D.; Lee, K.; Cho, S. N., et al. Emergence and wide dissemination of CTX-M-type ESBLs, and CMY-2- and DHA-1-type AmpC betalactamases in Korean respiratory isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **J Korean Med Sci**, v. 20, p. 961-965, 2005.

Zankari, E.; Hasman, H.; Cosentino, S.; Vestergaard, M.; Rasmussen, S.; Lund, O., et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J Antimicrob Chemother, v. 67, p. 2640-2644, 2012.

Zhang, G.; Ma, L.; Beuchat, L. R.; Erickson, M. C.; Phelan, V. H.; Doyle, M. P. Lack of internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in lettuce (*Lactuca sativa* L.) after leaf surface and soil inoculation. **J Food Prot**, v. 72, p. 2028-2037, 2009.

Zhao, W. H.; Hu, Z. Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Crit Rev Microbiol**, v. 39, p. 79-101, 2013.

Zheng, B.; Huang, C.; Xu, H.; Guo, L.; Zhang, J.; Wang, X.; et al. Occurrence and genomic characterization of ESBL-producing, *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* in farming soil. **Front Microbiol**, v. 8, p. 2510, 2017.

Zhou, X. Y.; Bordon, F.; Sirot, D.; Kitzis, M. D.; Gutmann, L. Emergence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1 beta-lactamase conferring resistance to beta-lactamase inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, p. 1085-1089, 1994.

Zhu, X.; Jin, L.; Sun, K.; Li, S.; Li, X.; Ling, W. Phenanthrene and pyrene modify the composition and structure of the cultivable endophytic bacterial community in ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam). **Int J Environ Res Public Health**, v. 13, p. 1081, 2016.

Zurfluh, K.; Glier, M.; Hachler, H.; Stephan, R. Replicon typing of plasmids carrying *bla*_{CTX-M-15} among *Enterobacteriaceae* isolated at the environment, livestock and human interface. **Sci Total Environ**, v. 521-522, p. 75-78, 2015a.

Zurfluh, K.; Nuesch-Inderbinen, M.; Morach, M.; Zihler Berner, A.; Hachler, H.; Stephan, R. Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. **Appl Environ Microbiol**, v. 81, p. 3115-3120, 2015b.

Zurfluh, K.; Nuesch-Inderbinen, M.; Morach, M.; Zihler Berner, A.; Hachler, H.; Stephan, R. Extended-spectrum-β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. **Appl Environ Microbiol**, v. 81, p. 3115-3120, 2015c.

Zurfluh, K.; Poirel, L.; Nordmann, P.; Klumpp, J.; Stephan, R. First detection of *Klebsiella variicola* producing OXA-181 carbapenemase in fresh vegetable imported from Asia to Switzerland. **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 4, p. 38, 2015d.