

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
FISIOPATOLOGIA E TOXICOLOGIA
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

**Resistoma de Bactérias Gram- Negativas de Importância Médica Isoladas de
Produtos Cárneos de Produção Livre de Antibióticos e Produção Convencional**

INGRITH NEVES

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman (FCF-USP, ICB-USP)

São Paulo
2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
FISIOPATOLOGIA E TOXICOLOGIA
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

**Resistoma de Bactérias Gram- Negativas de Importância Médica Isoladas de
Produtos Cárneos de Produção Livre de Antibióticos e Produção Convencional**

INGRITH NEVES

Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Nilton
Lincopan

Versão corrigida

São Paulo
2022

Ingrith Neves

RESISTOMA DE BACTÉRIAS GRAM- NEGATIVAS DE IMPORTÂNCIA
MÉDICA ISOLADAS DE PRODUTOS CÁRNEOS DE PRODUÇÃO LIVRE DE
ANTIBIÓTICOS E PRODUÇÃO CONVENCIONAL

Comissão Julgadora
Da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.
Orientador/ presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ___ de _____ de 2022.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

N511r Neves, Ingrith
 Resistoma de Bactérias Gram- Negativas de
Importância Médica Isoladas de Produtos Cárneos de
Produção Livre de Antibióticos e Produção Convencional
/ Ingrith Neves. - São Paulo, 2022.
 53 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Huenuman , Nilton Erbet Lincopan

1. Resistência antimicrobiana. 2. ESBL . 3.
Alimentos . 4. Clones internacionais . I. T. II.
Huenuman , Nilton Erbet Lincopan, orientador.

Dedico esta tese a Deus, meus pais, irmãos,
cunhadas, sobrinhos e minhas filhas de quatro patas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar saúde, proteção e força durante essa caminhada, sem Ele nada seria possível.

Agradeço aos meus pais por sempre estarem ao meu lado me apoiando e dando todo o suporte para eu realizar meus sonhos, amo muito vocês!

Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos que sempre estiveram ao meu lado e me encorajando a ir em busca do meu melhor.

As minhas babys de quatro patas, por estarem ali sempre me dando forças quando tudo parecia estar dando errado.

Muito obrigado ao meu orientador, Nilton Linconpan, por todos os ensinamentos e pela oportunidade de aprender e construir uma nova etapa em meu desenvolvimento profissional e pessoal, de coração muito obrigada!

Obrigada a Quézia Moura, por ter contribuído com seu conhecimento e experiência no mundo da pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório que contribuíram de alguma forma para meu crescimento e me ajudaram muito no desenvolvimento do meu trabalho.

Agradeço imensamente ao Elder que auxiliou com a montagem das árvores filogenéticas e ao Herrison por ter colaborado com a montagem do heatmap.

A minha colega que virou amiga do coração, Jéssica, por todos os momentos dentro e fora do laboratório, obrigada por me ouvir, chorar e desabafar, uma amizade que tem um cantinho especial em meu coração.

A Geisa Gimenez, a irmã/amiga e conselheira que São Paulo me deu de presente, obrigada por me escutar e ser meu ombro amigo em vários momentos,

Agradeço a todos meus amigos que mesmo de longe torceram e vibraram comigo cada etapa vencida.

Um muitíssimo obrigada a todos da Sesa- PR, Manu, Salésia, Marcos, Karina, por terem me incentivado e acreditado no meu potencial.

Por fim, agradeço imensamente de coração a todos que compartilharam cada minuto dessa etapa, que se finda por enquanto, pois ninguém sabe o dia de amanhã. Sou extremamente grata a todos os professores que me direcionaram para o caminho do conhecimento e agregaram em minha trajetória.

Obrigada a banca de doutores que se disponibilizou em fazer parte desse momento.

AGRADECIMENTOS ÀS AGÊNCIA DE FOMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

“Quanto mais aumento nosso conhecimento, mais
evidente fica nossa ignorância”.

John F. Kennedy

RESUMO

NEVES, I. **Resistoma de Bactérias Gram- Negativas De Importância Médica Isoladas De Produtos Cárneos De Produção Livre De Antibióticos E Produção Convencional**. 2022. 54f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Estudos epidemiológicos têm mostrado que a propagação e disseminação de bactérias resistentes a antibióticos de uso clínico, não é um problema restrito a hospitais, mas também se estende ao meio ambiente e alimentos. O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de alimentos, tanto de origem vegetal quanto animal e para manter sua elevada produtividade de carnes, tem adotado o uso de antimicrobianos extensivamente na cadeia produtiva da carne. O objetivo do trabalho é obter e analisar dados genômicos de bactérias Gram-negativas resistentes aos antibióticos de importância médica, isoladas de produtos cárneos de sistemas de produção livre de antibióticos e de produção convencional. Foram analisadas amostras comerciais de carne de frango ($n=12$), carne bovina ($n=10$) e carne suína ($n=10$), de diferentes marcas, coletadas entre agosto de 2019 a fevereiro de 2020. As amostras foram triadas em ágar MacConkey suplementado com ceftriaxona e colistina, a fim de selecionar fenótipos de produção de ESBL (β -lactamases de espectro estendido), pAmpC e MCR (mobile colistin resistance). Os isolados foram identificados pela técnica MALDI-TOF e foram submetidos ao teste de suscetibilidade antimicrobiana pela técnica do disco-difusão. Do total de amostras analisadas, 46,9% foi positiva para *Escherichia coli* ($n=15$) multirresistente, e destas, nove foram sequenciadas na plataforma Illumina. A análise das sequências revelou a presença dos genes *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{CTX-M-55}, os quais conferem resistência a penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, utilizadas no tratamento de infecções humanas e veterinárias; além de outros genes e mutações que conferem resistência a tetraciclinas (*tetA*, *tetB*), sulfonamidas (*sul1*, *sul2*), fosfomicina (*fosA3*), quinolonas [*gyrA* (S83L, D87N, D87G), *parC* (S80I)], aminoglicosídeos [*aadA1*, *ant(3'')-Ia*, *aac(3)-Via*, *aadA2*, *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*] e macrolídeos [*mdf(A)*]. Genes de tolerância para metais pesados (incluindo arsênio, telúrio e mercúrio), desinfetantes (amônios quaternários) e agrotóxicos (glifosato) foram também preditos. Além disso, foram identificados genes de virulência que codificam para toxinas, aderência, sideróforos e sistema de secreção. As cepas pertenceram aos clones internacionais sequência tipo ST38, ST2179, ST443, ST57, ST117. Nossos resultados reportam a presença de patógenos de prioridade crítica em carnes “antibiotic-free”, alertando sobre a possibilidade de que alimentos de origem animal possam ser fontes que contribuem para a disseminação silenciosa destes patógenos, e/ou seus genes de resistência.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana, Alimentos, Clones internacionais, Patógenos de prioridade crítica, ESBL

ABSTRACT

NEVES, I. **Comparative Resistome of Medically Important Gram-Negative Bacteria Isolated from Antibiotic-Free and Conventional Raw Meat Samples.** 2022. 54f. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Epidemiological studies have shown that the propagation and spread of bacteria resistant to antibiotics in clinical use, is not a problem restricted to hospitals, but also extends to the environment and food. Brazil is one of the largest food producers and exporters, both plant and animal origin and to maintain its high productivity of meat, it has adopted the use of antimicrobial extensively in the production chain of meat. The objective of the work is to obtain and analyze genomic data of Gram-negative bacteria resistant to antibiotics of medical importance, isolated from meat products of antibiotic-free and conventional production systems. Analyzed commercial samples of chicken (n = 12), beef (n = 10) and pork (n = 10) of different marks, collected from August 2019 to February 2020. Samples were screened on agar MacConkey supplemented with ceftriaxone and colistin, in order to select phenotypes of production of ESBL (extended-spectrum β -lactamases), pAmpC and MCR (mobile colistin resistance). The isolates were identified by the MALDI-TOF technique and were subjected to the antimicrobial susceptibility test by the disk-diffusion technique. Of the total samples analyzed, 46.9% were positive for *Escherichia coli* (n = 15) MDR, and these nine were sequenced on the Illumina platform. Sequence analysis revealed the presence of genes *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{CTX-M-55}, which provide resistance to penicillins and cephalosporins of broad spectrum, used in the treatment of human and veterinary infections; in addition to other genes and mutations that confer resistance to tetracyclines (*tetA*, *tetB*), sulfonamides (*sul1*, *sul2*), fosfomycin (*fosA3*), quinolones [*gyrA* (S83L,D87N,D87G), *parC* (S80I)], aminoglycosides [*aadA1*, *ant(3'')-Ia*, *aac(3)-Via*, *aadA2*, *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*] e macrolídeos [*mdf(A)*]. Tolerance genes for heavy metals (including arsenic, tellurium and mercury), disinfectants (quaternary ammonia) and pesticides (glyphosate) were also predicted. In addition, virulence genes that code for toxins, adherence, siderophores and secretion system have been identified. The strains belonged to the international clones of type ST38, ST2179, ST443, ST57, ST117. Our results report the presence of pathogens of critical priority in “antibiotic-free” meats, warning about the possibility that foods of animal origin may be sources that contribute to the silent spread of these pathogens, and / or their resistance genes.

Keywords: Antimicrobial resistance, Food, International clones, Critical priority pathogens, ESBL

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Possíveis rotas de transmissão de bactérias resistente a antibióticos.....	18
Figura 2. Status atual da resistência a antibióticos/superbactérias	19
Figura 3. Heatmap de resistoma, viruloma e plasmidoma das cepas isoladas de CF....	37
Figura 4. Árvore filogenética da estirpe F1B (ST443), isolada de CF de produção “antibiotic-free”	40
Figura 5. Árvore filogenética da estirpe FBP3 (ST38), isolada de CF de produção convencional.....	41
Figura 6. Árvore filogenética da estirpe FCC3 (ST350), isolada de CF de produção convencional.....	42
Figura 7. Árvore filogenética da estirpe FBC4 (ST2040), isolada de CF de produção convencional,.....	43
Figura 8. Árvore filogenética da estirpe FCC4 (ST2179), isolada de CF de produção convencional.....	44
Figura 9. Árvore filogenética da estirpe FCC8 (ST3258), isolada de CF de produção “antibiotic-free”	45
Figura 10. Árvore filogenética da estirpe FCC10 (ST641), isolada de CF de produção “antibiotic-free”	46
Figura 11. Árvore filogenética da estirpe FSW11(ST117), isolada de CF de produção “antibiotic-free”	47
Figura 12. Árvore filogenética da estirpe FSE11 (ST57), isolada de CF de produção “antibiotic-free”	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados sobre região, produção, armazenamento, marca e data sobre as colheitas de Carne de Frango (CF).....	26
Tabela 2. Dados sobre região, produção, armazenamento, marca e data sobre as colheitas de Carne Suína (CS).....	27
Tabela 3. Dados sobre região, produção, armazenamento, marca e data sobre as colheitas de Carne Bovina (CB).....	28
Tabela 4. Relação de amostras com seus respectivos ST's e cepas utilizadas na montagem da filogenia das cepas sequenciadas,.....	32
Tabela 5. Antibiograma das amostras de carne de frango e suíno.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC - Amoxicilina- Ácido Clavulânico

AMI – Amicacina

AmpC - Cefalosporinase

ATM – Aztreonam

BPW – Água peptonada (do inglês *Buffered peptone water*)

CAZ – Ceftazidima

CB - Carne Bovina

CEFAP - Centro de Facilidade para a Pesquisa

CF – Carne de Frango

CFO - Cefoxitina

CIP - Ciprofloxacina

CLO - Cloranfenicol

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CPM - Cefepima

CTX - Cefotaxima

CTX-M - Cefotaximase

CRO – Ceftriaxona

CS – Carne Suína

ERT - Ertapenem

ESBL - β -Lactamase de Espectro Estendido (do inglês, *Extended-Spectrum β -lactamase*)

FDA - *Food and Drug Administration*

GEN - Gentamicina

IPM – Imipenem

MALDI-TOF - *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*

MDR - Multirresistência (do inglês *Multidrug-resistant*)

MER - Meropenem

MH - Mueller-Hinton

MLST - *Multilocus sequence type*

NAL - Ácido nalidíxico

OMS - Organização Mundial da Saúde

PIB – Produto Interno Brasileiro

ST - *Sequence typing*

STX - Sulfametoxazol-Trimetropim

WGS – Sequenciamento completo do genoma (do inglês, *Whole Genome Sequencing*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Resistência Antimicrobiana	17
1.2 Antimicrobianos e o meio ambiente	18
1.3 Antimicrobianos na medicina veterinária	19
1.4 Agronegócio no Brasil	20
1.5 Enterobactérias e ESBL	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Colheita e transporte das amostras	24
3.2 Processamento das amostras e isolamento e identificação bacteriana	29
3.3 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de uso humano e veterinário e caracterização fenotípica de ESBL	29
3.4 Sequenciamento, montagem e análise genômica	30
3.5 Estudos filogenéticos	31
4 RESULTADOS	33
4.1 Isolamento e perfil de susceptibilidade dos isolados	33
4.2 Resistência e Virulência	35
4.3 Filogenia	38
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÕES	50
<u>REFERÊNCIAS</u>	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resistência Antimicrobiana

A resistência antimicrobiana é um acontecimento natural, por sua vez, esse mecanismo pode ser intrínseco, adquirida ou adaptável. Quando as modificações ocorrem e são inerentes as propriedades da bactéria são classificadas como intrínseco, exemplo resistência a glicopeptídeos presente em bactérias gram negativas. A resistência adquirida é quando uma bactéria anteriormente sensível apresenta modificações e agora exibe mecanismos de resistência, através de mutação ou aquisição de material genético de fonte exógena, esta pode mostrar-se por meio de transformação, quando fragmentos de DNA de uma bactéria morta são incorporados ao cromossomo de uma bactéria receptora; transdução, a transferência é mediada por um bacteriófago; conjugação, a transferência é por contato físico de uma célula com outra célula, através de um plasmídeo, e cada plasmídeo é capaz de carrear múltiplas resistências por meio de elementos genéticos moveis, como transposons, integrons e regiões de inserção. Resistências mediadas por plasmídeo são de maior preocupação mundial, devido ao fato de carrear inúmeros genes de resistência a múltiplas drogas. (Cristaki et al, 2019)

Estima-se que até 2050, aproximadamente 10 milhões de pessoas podem morrer por ano em consequência de doenças causadas por bactérias resistentes a medicamentos (ONU, 2019; BIOMÉRIEUX, 2020)

A resistência bacteriana é um problema crítico de saúde pública global e, baseado nisso, em 2017, a OMS (Organização Mundial da Saúde) definiu a problemática da resistência bacteriana como questão prioritária e publicou uma lista com patógenos de prioridade crítica, a qual inclui enterobactérias produtoras de ESBL (β -lactamase de espectro estendido). Preocupantemente, essas bactérias não estão restritas a ambientes

hospitalares, mas estão disseminadas no ambiente e em animais, principalmente animais de produção, os quais são importantes vetores de transmissão das mesmas, seja por contato direto com outros animais, pessoas ou ambiente, ou através do consumo da carne e produtos, impactando não só a saúde pública, como também o setor econômico (WHO, 2017) (**Figura 1**).



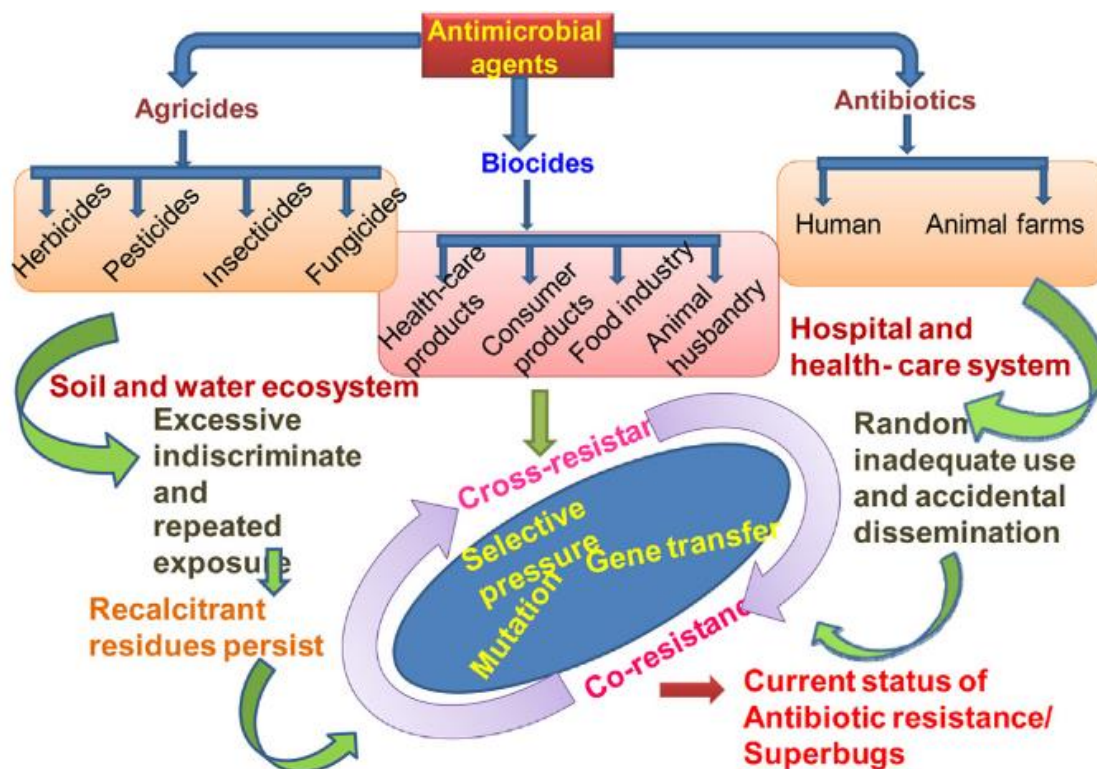
Fonte: Biomerieux.

Figura 1. Possíveis rotas de transmissão de bactérias resistente a antibióticos

1.2 Antimicrobianos e o meio ambiente

O uso excessivo e extensivo de agrotóxicos, como fungicidas, herbicidas, pesticidas e inseticidas tem contribuído para o surgimento de bactérias multirresistentes (MDR), pois esses compostos geram resíduos e penetram no solo e lençóis freáticos, colaborando com o desenvolvimento da pressão seletiva. Alguns genes que carregam resistência para agrotóxicos, apresentam concomitante resistência a desinfetantes e metais pesados. Da mesma maneira, como ocorre com o uso de biocidas, ausência de

esgotamento sanitário, medicamentos e contaminantes, esses fatores contribuem e aceleram o processo de surgimento e disseminação de bactérias MDR (PAUL et al., 2019) (**Figura 2**).



Fonte: Paul et al., 2019

Figura 2. Status atual da resistência a antibióticos/superbactérias

Todos esses usos inadequados e disseminação acidental, exercem uma pressão seletiva sobre esses microrganismos e colaboram com a rápida disseminação de patógenos MDR, ocasionando prejuízos enormes para a saúde pública.

1.3 Antimicrobianos na medicina veterinária

Na década de 50, houve o início da era da utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento na pecuária, pois após alguns estudos foi possível notar a melhoria no ganho de peso, melhor conversão alimentar, melhorias com a saúde do plantel, reduzindo a taxa de mortalidade. Entretanto, com o decorrer do tempo e com e a

utilização desses fármacos, aumentou a prevalência de bactérias MDR (VACCINAR, 2020).

Em 2016, estudos identificaram um novo mecanismo de transferência de gene de resistência, as polimixinas, em *Escherichia coli* mediado por um gene plasmidial *mcr-1*. No mesmo ano, no Brasil foi proibido o uso da colistina em todo território brasileiro, para fins zootécnicos, como melhorador de desempenho na alimentação animal (THANTHIRIGE et al., 2016; LIU et al., 2016).

Em 2020, o MAPA, proibiu o uso de mais três antimicrobianos, tiamulina, tilosina e lincomicina, com fins zootécnicos na adição da alimentação animal, dado que são antibióticos importantes na medicina human (BRASIL, 2020).

1.4 Agronegócio no Brasil

No Brasil, o agronegócio é considerado uma das principais atividades econômicas, sendo responsável por 27,4 % do Produto Interno Bruto (PIB) (CEPEA, 2020). Em 2020, o Brasil ocupou o primeiro lugar no ranking de exportação de carne de aves com aproximadamente 4,3 milhões de toneladas exportadas e rendeu US\$ 6,6 bilhões a economia brasileira, o Brasil ocupou o segundo lugar com aproximadamente 7 milhões de toneladas de carnes exportadas (frango, bovino e suíno) (ARAGÃO et al., 2020). Entretanto, o crescimento do agronegócio traz consigo um grande desafio – o de aumentar a competitividade brasileira no comércio internacional de produtos agrícolas, sobretudo com o estímulo às cadeias produtivas e ao aumento do valor agregado dos produtos brasileiros e, por outro lado, o de consolidar o Brasil como provedor de produtos seguros, elevada qualidade e produzidos de forma sustentável (ITIE, 2020).

Os sistema de criação de animais, o extensivo e intensivo, são baseados na pastagem ou no confinamento, respectivamente. Todos os sistemas apresentam

vantagens e desvantagens, com relação ao primeiro a vantagem é requerer baixo investimento, e a desvantagem é a necessidade ter de grandes áreas e apresentar um grande impacto na degradação de áreas verdes. A respeito do sistema intensivo, conhecido como sistema de confinamento, semiconfinamento a vantagem é a possibilidade de criar um maior número de animais em uma menor área, através da utilização de máquinas e insumos, em compensação a desvantagem é a necessidade de maiores investimentos na saúde e bem-estar animal, através dos cuidados mais intensos com a saúde, pois quanto maior a densidade de animais por m², maior a ocorrência de doenças virais e bacterianas. Desse modo, a utilização de antimicrobianos de modo profilático e terapêutico, colabora para a disseminação e que esses animais se tornem reservatórios de bactérias MDR.(BASSI et., 2017; NUTRIÇÃO SAÚDE ANIMAL, 2020; FGV, 2020)

Outro sistema que tem ganhado espaço no mercado mundial é a produção de alimentos orgânicos e *antibiotic free*. A produção orgânica tem como pilar principal a sustentabilidade do meio ambiente, recompondo a fertilidade do solo, sem o uso de fertilizantes, drogas veterinárias e aditivos sintéticos, conseqüentemente, oferecendo ao consumidor produtos mais saudáveis e conservação do meio ambiente (NUTRIÇÃO SAÚDE ANIMAL, 2020; FGV, 2020; EJAZ, et al., 2021; DANTAS, et al., 2020).

Doenças transmitidas por alimentos é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, e entre os principais causadores de doenças diarreicas, estão bactérias da família Enterobacteriaceae, como *Salmonella*, *Eschecheria coli*, *Shigella* e entre outras. A produção de alimentos é um setor muito importante para seleção e reservatório de bactérias resistentes. Dessa maneira, governos tem se mobilizado para estabelecer e elaborar planos de vigilância e controle de bactérias MDR. de bactérias

MDR através da cadeia alimentar ainda não é clara, mas estudos tem se mostrado cada vez mais promissores em demonstrar possíveis ligações entre alimentos, humanos e animais de produção (EJAZ, et al., 2021; DANTAS, et al., 2020).

1.5 Enterobactérias e ESBL

Escherichia coli é uma bactéria Gram negativa comensal presente na microbiota intestinal de humanos e animais, pode ser tornar patogênica e causar doenças gastrointestinais que podem levar até a morte. Um importante mecanismo de resistência e cada vez mais encontrado é a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), cefalosporinases AmpC (AmpC), ou ambas, resultando na inativação enzimática de β -lactâmicos. A prevalência global de genes de β -lactamase (por exemplo, *bla*) aumentou consideravelmente nos últimos 30 anos em todo o mundo, tanto em humanos quanto em animais (DANTAS, et al., 2020; MOSTAFA, et al., 2020).

E.coli são organismos indicadores de contaminação fecal e grande têm potencial para adquirir genes de resistência via transferência horizontal e/ou mediadas por mutações e sua disseminação não se restringe à hospitais, mas também no meio ambiente e alimentos (Manyi-Loh et al., 2018; IWU et al., 2020; CASELLA et al., 2015; FERNANDES et al., 2016; INÁCIO et al., 2018; MONTE et al., 2017; MOURA, et al., 2018; MENDONÇA, et al., 2022; GUIMARÃES, et al., 2010).

Os antimicrobianos β -lactâmicos são a classe mais utilizada no tratamento doenças devido a sua baixa toxicidade, alta eficácia e sua elevada margem de segurança. A maioria dos antibióticos desses antibióticos pertencem a classe de cefalosporinas, que são divididos de acordo com a seu espectro de ação, primeira, segunda, terceira e quarta

gerações. Consequentemente, o mecanismo de resistência de maior importância desenvolvido por bactérias Gram negativas é a produção de enzimas β -lactamases (DANTAS, et al., 2020 MENDONÇA, et al., 2022; GUIMARÃES, et al., 2010; MC DONALD et al., 2021).

As β -lactamases de espectro estendido são classificadas em diferentes famílias, como tipo TEM, tipo SHV, tipo OXA e tipo CTX-M. O grupo CTX-M é o que mais tem apresentado aumento não apenas em número mas em diversidade também, além de ser um dos principais mecanismos de resistência às cefalosporinas de terceira geração e quarta geração, através da hidrólise do anel beta-lactâmico e podem ser inibidas por ácido clavulânico, vaborbactam e avibactam) (MC DONALD et al., 2021; FERREIRA, et al., 2016).

As β -lactamases do tipo AmpC são capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração, através de indução ou superexpressão de genes *ampC* localizados em cromossomos e a aquisição de genes *ampC* codificados por plasmídeos (por exemplo, *bla* *bla*_{Cmy-like}, *bla*_{Como ACC}, *bla*_{DHA-like}) (PIETSCH et al., 2018). Estudos vem sendo realizados e demonstram a importância na disseminação de bactérias produtoras de ESBL e AmpC no mundo todo (DANTAS, et al., 2020)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O projeto analisou comparativamente o resistoma de bactérias Gram-negativas de importância médica, isoladas de produtos cárneos convencionais e livre de antibióticos

2.2 Objetivos específicos

- Identificar a presença de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. enterica* resistentes a cefalosporinas e polimixinas, em carnes de frango, bovina e suína convencionais e livre de antibióticos.
- Avaliar a ocorrência dessas bactérias entre as diferentes regiões da cidade de São Paulo.
- Comparar a ocorrência dessas bactérias entre carnes de produção livre de antibióticos e produção convencional;
- Comparar a ocorrência dessas bactérias entre carnes congeladas e carnes resfriadas ;
- Avaliar o perfil fenotípico de resistência antimicrobiana das bactérias isoladas;
- Identificar genes de resistência a cefalosporinas, polimixinas, metais pesados e desinfetantes;
- Avaliar a presença e persistência de linhagens bacterianas específicas com relação ao resistoma (antibióticos, metais pesados e desinfetantes).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Colheita e transporte das amostras

Entre agosto de 2019 e fevereiro de 2020, foram coletadas 32 amostras de carne de: i) frango [CF; ($n=12$;) de sete marcas distintas [MF1-MF7; (**Tabela 1**); e ii) suína [CS; ($n=10$) de oito marcas distintas [MS1-MS8; (**Tabela 2**); iii) bovina [CB; ($n=10$)] de seis marcas distintas [MB1-MB6; (**Tabela 3**)];. A fim de avaliar diferentes tipos de produção e armazenamento pré-venda, foram coletadas amostras: i) produção convencional [CF ($n=5$); CB ($n=8$); CS ($n=10$)]; ii) produção livre de antibióticos [*“antibiotic-free”*; CF ($n=7$); CB ($n=2$)]; iii) congeladas [CF ($n=7$); CS ($n=1$)]; e iv) resfriadas [CF ($n=5$); CB ($n=10$); CS ($n=9$)].

As coletas ocorreram em mercados varejistas na cidade de São Paulo, nas regiões Central, Norte, Oeste, Leste e Sul. Após a colheita, as amostras foram acondicionadas e transportadas, em isopor com gelo, até o laboratório, onde foram mantidas a 4 °C até serem processadas (em até 12 horas).

Tabela 1. Dados sobre região, produção, armazenamento, marca e data sobre as colheitas de Carne de Frango (CF).

Amostra	Latitude/Longitude	Região	Produção	Armazenamento	Marca	Data
F1/ F1B	-23.584116, -46.675874	Sul	Antibiotic-free/ File de Peito	Congelada	MF1	16/07/2019
F2/ FCC2	-23.572300, -46.695667	Oeste	Antibiotic-free/ Coxa e sobrecoxa	Resfriada	MF1	18/11/2019
F3/ FCC3 e FBC3	-23.598493, -46.681009	Sul	Convencional/ File de peito	Congelada	MF2	24/11/2019
F4/ FCC4 e FBC4	-23.600867, -46.678758	Sul	Convencional/ File de peito	Resfriada	MF3	02/12/2019
F5/ FCC5	-23.56946, -46.660808	Sul	Antibiotic-free/ Coração	Congelada	MF1	06/01/2020
F6/	-23.541622, -46.629092	Centro	Convencional/ File de peito	Resfriada	MF4	13/01/2020
F7/ FCC7	-23.559412, -46.631113	Centro	Convencional/ File de peito	Resfriada	MF5	20/01/2020
F8/ FCC8	-23.501683, -46.636893	Norte	Antibiotic-free/ Sobrecoxa	Congelada	MF1	27/01/2020
F9/ FCC9	-23.540316, -46.470632	Leste	Convencional/ Coxinha de asa	Resfriada	MF3	10/02/2020
F10/ FCC10	-23.593285, -46.636032	Sul	Antibiotic-free/ File de frango	Congelada	MF1	10/02/2020
F11/ FSE11	23.574489, 46.739841	Oeste	Antibiotic-free/ file de coxa e sobrecoxa	Congelada	MF6	17/02/2020
F12/ FSW11	23.574489, 46.739841	Oeste	Antibiotic-free/ coxinha de asa	Congelada	MF7	17/02/2020

Tabela 2. Dados sobre região, produção, armazenamento, marca e data sobre as colheitas de Carne Suína (CS).

Amostra	Latitude/Longitude	Região	Produção	Armazenamento	Marca	Data
S1	-23.584116, -46.675874	Sul	Convencional/ Lombo	Resfriada	MS1	16/07/2019
S2	-23.572300, -46.695667	Oeste	Convencional/ Barriga	Resfriada	MS2	18/11/2019
S3	-23.598493, -46.681009	Sul	Convencional/ file mignon	Congelada	MS3	24/11/2019
S4	-23.600867, -46.678758	Sul	Convencional/ Costela	Resfriada	MS3	02/12/2019
S5	-23.56946, -46.660808	Sul	Convencional/ Bisteca	Resfriada	MS2	06/01/2020
S6	-23.541622, -46.629092	Center	Convencional/ Bisteca	Resfriada	MS4	13/01/2020
S7	-23.559412, -46.631113	Center	Convencional/ Pernil	Resfriada	MS5	20/01/2020
S8	23.501683, 46.636893	Norte	Convencional/ Lombo	Resfriada	MS6	27/01/2020
S9	-23.540316, -46.470632	Leste	Convencional/ Bisteca	Resfriada	MS7	03/02/2020
S10	-23.593285, -46.636032	Norte	Convencional/ Toucinho	Resfriada	MS8	10/02/2020

Tabela 3. Dados sobre região, produção, armazenamento, marca e data sobre as colheitas de Carne Bovina (CB).

Amostra	Latitude/Longitude	Região	Produção	Armazenamento	Marca	Data
B1	-23.584116, -46.675874	Sul	<i>Antibiotic-free/ Alcatra</i>	Resfriada	MB1	16/07/2019
B2	-23.572300, -46.695667	Oeste	Convencional/ Contra file	Resfriada	MB2	18/11/2019
B3	-23.598493, -46.681009	Sul	Convencional/ carne molda	Resfriada	MB3	24/11/2019
B4	-23.600867, -46.678758	Sul	Convencional/ Coxão mole	Resfriada	MB4	02/12/2019
B5	-23.56970. -46.66077	Sul	Convencional/ Coxão mole	Resfriada	MB5	02/12/2019
B6	-23.541622, -46.629092	Centro	Convencional/ Fígado	Resfriada	MB6	13/01/2020
B7	-23.559412, -46.631113	Centro	Convencional/ Coxão mole	Resfriada	MB7	20/01/2020
B8	23.501683, 46.636893	Norte	Convencional/ Bife patinho	Resfriada	MB8	27/01/2020
B9	-23.540316, -46.470632	Leste	Convencional/ Picanha	Resfriada	MB9	03/02/2020
B10	-23.593285, -46.636032	Norte	<i>Antibiotic-free/ Carpacio de Lagarto</i>	Resfriada	MB1	10/02/2020

3.2 Processamento das amostras e isolamento e identificação bacteriana

O processamento das amostras foi baseado conforme recomendações descritas nos protocolos oficiais do FDA (*Food and Drug Administration*) modificado *in house*. (FDA, 2021). Resumidamente, 100g de cada amostra coletada foi acondicionada em um saco estéril (Whirl-Pak; Nasco, W) contendo 225 mL de água peptonada tamponada (BPW, do inglês *Buffered peptone water*) e foi deixada em repouso por 15 minutos, para a produção do “enxague”. Posteriormente, para o isolamento de bactérias Gram-negativas, uma alíquota de 25ml de cada “enxague” foi transferida para um novo saco estéril contendo 25 ml de caldo MacConkey estéril que, em seguida, foram devidamente incubados em estufa, por 24 horas.

Com o auxílio de uma alça bacteriológica, uma alíquota de 10 µl de cada amostras foi inoculada em diferentes placas de ágar MacConkey suplementadas com ceftriaxona (2 µg/mL) e colistina (2 µg/mL), sendo incubada a 37 °C, por 18-24 horas. Todas as amostras que apresentaram crescimento bacteriano na presença de antibiótico tiveram as colônias isoladas e submetidas à identificação pelo MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*).

3.3 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de uso humano e veterinário e caracterização fenotípica de ESBL

O perfil de susceptibilidade de cada isolado foi determinado pelo teste de disco difusão (método de Kirby-Bauer) em ágar Muller-Hinton [MH; (BD - Becton Dickinson Microbiology Systems and Company Sparks, USA)] e os resultados foram interpretados de acordo com os padrões para antibióticos de uso humano e *Clinical and Laboratory Standards Institute* [CLSI, (2018) para antibióticos de uso veterinário.

Foram testados os seguintes antibióticos: amoxicilina-ac. clavulânico (20/10 µg), cefalotina (30 µg), cefoxitina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), aztreonam (30 µg), ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ácido-nalidíxico(30 µg), ciprofloxacina (5 µg), enrofloxacin (5 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), amicacina (10 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (23.75/1.25 µg), e tetraciclina (30 µg). A triagem para produção de ESBL foi feita pelo teste de aproximação de discos (DDST), onde quatro discos de cefalosporinas foram dispostos a 30 mm de distância de um disco de amoxicilina-ac. clavulânico, para avaliar a ocorrência de reação sinérgica (indicativo de produção de ESBL) (FETAHAGIĆ, 2021).

3.4 Sequenciamento, montagem e análise genômica

O critério para a seleção de cepas submetidas a extração, sequenciamento e montagem genômica, foi a expressão do perfil de resistência a antibióticos de importância médica, por meio do antibiograma. O DNA de cada estirpe multirresistente foi extraído pelo kit PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo (Life Technologies, Carlsbad, CA), conforme recomendações do fabricante. O sequenciamento das amostras foi realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da USP, no Centro de Facilidades de apoio à Pesquisa (CEFAP-GENIAL) (<http://cefap.icb.usp.br/core-facilities/genial-genome-investigation-and-analysis-laboratory/>), utilizando a plataforma Illumina NextSeq (150 bp).

As sequências geradas foram submetidas à montagem *de novo* na versão vigente do programa SPAdes v3.13 (BANKEVICH, et al, 2019). Em seguida, os genomas montados submetidos à anotação automática pela ferramenta NCBI Prokaryotic

Genome Annotation Pipeline (PGAP) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/), e depositados no banco de genomas do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>).

A identificação dos genes de resistência aos antibióticos foi realizada pelo *software* ResFinder 4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). Por sua vez a identificação de genes de resistência aos metais pesados e compostos quaternários de amônio foi realizada pelo *software* ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>), utilizando um banco de dados desenvolvido *in house*.

A determinação plasmidial foi realizada pelo *software* PlasmidFinder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>). Para determinação do MLST (Multi Locus Sequence Typing), foi utilizado o *software* MLST 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>).

Os genes de virulência foram identificados pelo *software* Virulence Factor Database (VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>), o filogrupa pela ferramenta Clermon Typing (<http://clermontyping.iame-research.center/>), o sorotipo pela ferramenta SerotypeFinder 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>) e fímbria FimTyper 1.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/FimTyper/>).

3.5 Estudos filogenéticos

Para fins filogenéticos, consideramos todos os conjuntos de genoma com dados, país, ano de coleta e fonte de isolamento para cada um dos STs do banco de dados *Escherichia/Shigella* no Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk>).

Para cada ST, a identidade nucleotídica média (ANI) entre as cepas de *E. coli* e os conjuntos de genoma baixados foi obtida usando FastANI v1.32 (<https://github.com/ParBLiSS/FastANI>), e os 30 genomas com maior ANI foram

selecionados para análise filogenética. Como genomas de referência, usamos sequências cromossômicas de *E. coli*, com seus respectivos ST, identificações e números de acesso (**Tabela 4**). Todos os genomas de referência foram escolhidos com base nos resultados da pesquisa Enterobase. Os genes de resistência e replicons plasmidiais utilizamos o software ABRicate v1.0.1 (<https://github.com/tseemann/abricate>), bancos de dados ResFinder e PlasmidFinder. Os limites de cobertura e identidade foram definidos para 90%. O iTOL v6 (<https://itol.embl.de>) foi usado para enraizar as árvores no ponto médio e anotar as árvores com dados de Enterobase e ABRicate.

Tabela 4. Relação de amostras com seus respectivos ST's e cepas utilizadas na montagem da filogenia das cepas sequenciadas,

Amostra	Espécie/ ST's	Cepa	Número de acesso
FB1	<i>E. coli</i> ST443	2014C-3307	NZ_CP027368.1
FBP3	<i>E. coli</i> ST 38	144	NZ_CP023364.1
FCC3	<i>E. coli</i> ST350	NCTC9112	NZ_LR134079.1
FBC4	<i>E. coli</i> ST 2040	1500	NZ_CP040269.1
FCC4	<i>E. coli</i> ST2179	BR03-DEC	NZ_CP035321.1
FCC8	<i>E. coli</i> ST3258	14EC020	NZ_CP024138.1
FCC10	<i>E. coli</i> ST641	1916D18	NZ_CP046000.1
FSW11	<i>E. coli</i> ST117	14EC020	NZ_CP024138.1
FSE11	<i>E. coli</i> ST57	NCTC10444	NZ_LR134092.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento e perfil de susceptibilidade dos isolados

Das 32 amostras coletadas de carne coletadas (CF, CB e CS), 12 (37,5%) apresentaram isolados com fenótipo de resistência de interesse no antibiograma. Dentre estas amostras, foram apenas isolados de *Escherichia coli*, as quais exibiram diferentes perfis de resistência. Das 14 cepas, 13 [92,85%; carne de frango ($n=11$); carne suína ($n=1$)] foram categorizadas como multirresistentes, pois apresentaram resistência a pelo menos três diferentes classes de antibióticos; enquanto 01 isolado (carne suína) apresentou resistência apenas aos β -lactâmicos (**Tabela 5**). Com relação as demais bactérias *Salmonella* spp. e *Klebsiella* spp. não foram isoladas em nenhuma das amostras.

Tabela 5 Antibiograma das amostras de carne de frango e suíno.

Cepa	Marca	Espécie	Ano	Região da Cid. de SP	Origem ^a	Tipo de produção /armazenamento ^b	Perfil de susceptibilidade ^c											
							AMC	CRO	CTX	CAZ	CPM	CFO	ATM	NAL	CIP	AMI	GEN	SUT
F1B	MF1	<i>E. coli</i>	2019	Sul	CF	AF/CGL	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S
FCC2	MF1	<i>E. coli</i>	2019	Oeste	CF	AF/RFD	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S
FCC3	MF2	<i>E. coli</i>	2019	Sul	CF	CVL/CGL	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R
FBP3	MF2	<i>E. coli</i>	2019	Sul	CF	CVL/CGL	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	S
FCC4	MF3	<i>E. coli</i>	2019	Sul	CF	CVL/RFD	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	S
FBC4	MF4	<i>E. coli</i>	2019	Sul	CF	CVL/RFD	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	S
FBC6	MF4	<i>E. coli</i>	2020	Sul	CF	CVL/RFD	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
FSE11	MF6	<i>E. coli</i>	2020	Oeste	CF	AF/CGL	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S
FSW11	MF7	<i>E. coli</i>	2020	Oeste	CF	AF/CGL	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S
FCC7	MF8	<i>E. coli</i>	2020	Centro	CF	CVL/RFD	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R
FCC8	MF1	<i>E. coli</i>	2020	Norte	CF	AF/CGL	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
FCC10	MF1	<i>E. coli</i>	2020	Sul	CF	AF/CGL	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S
SCB8	MS6	<i>E. coli</i>	2020	Norte	CS	CVL/RFD	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R
SCB10	MS8	<i>E. coli</i>	2020	Norte	CS	CVL/RFD	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

^aCF, carne de frango; CS, carne suína.

^bAF, *antibiotic-free*; CGL, congelada; CVL, convencional; RFD, resfriada.

^cAMC, Amoxicilina -ácido Clavulânico; AMI, amicacina; ATM, Aztreonam; CAZ, Ceftazidima; CIP, Ciprofloxacina; CPM, Cefepima; CRO, Ceftriaxona; CTX, Cefotaxima; GEN, gentamicina; NAL, Ácido Nalidíxico; SUT, Sulfametoxazol-Trimetopim.

Dentre as amostras de frango ($n=12$), foi observado 83,33% (10/12) de positividade de contaminação por *E. coli*. Foi possível identificar contaminação em 80% das amostras de produção convencional (4/5); já amostras de produção *antibiotic-free* apresentaram 85,71% (6/7) de contaminação. Sobre o armazenamento pré-venda, amostras resfriadas e congeladas apresentaram 41,66% e 58,33% de contaminação, respectivamente. Interessantemente, foi possível identificar contaminação em todas as marcas [MF1 (4/5); MF2 (1/1); MF3(1/1); MF6(1/1); MF7(1/1)], entretanto, 02 amostras [16,67%; MF1 (1/5); MF4 (1/1)] apresentaram esterilidade na triagem de bactérias Gram-negativas resistentes aos β -lactâmicos e/ou polimixinas. Em relação a localização de coleta, as cinco regiões de São Paulo, todas as amostras apresentaram contaminação.

Dentre as amostras de carne suína ($n=10$), foi possível identificar 20% (2/10) de positividade de contaminação por *E. coli*. Curiosamente, apesar de pertencerem a marcas distintas [MS6 (1/1) e MS8 (1/1)], ambas amostras são de produção convencional e tiveram armazenamento pré-venda do tipo resfriamento e foram coletadas na região Norte da cidade de São Paulo.

Dentre amostras de carne bovina ($n=10$), não foi possível identificar contaminação por nenhuma bactéria Gram-negativa resistente aos β -lactâmicos e/ou polimixinas.

4.2 Resistência e Virulência

Nos genomas analisados encontramos a presença dos genes *bla*_{CMY-2} [22,22% (2/9)], *bla*_{CTX-M-2} [22,22% (2/9)], *bla*_{CTX-M-8} [22,22% (2/9)] e *bla*_{CTX-M-55} [33,33% (3/9)], os quais conferem resistência a penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, genes e mutações que conferem resistência a tetraciclina (*tetA*, *tetB*) [66,66% (6/9)], sulfonamidas (*sul1*, *sul2*) (77,77% [7/9]), fosfomicina (*fosA3*) (33,33% [3/9]),

quinolonas [*gyrA* (S83L, D87N, D87G), *parC* (S80I)] [44,44% (4/9)], aminoglicosídeos [*aadA1*, *ant(3'')-Ia*, *aac(3)-Via*, *aadA2*, *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*] [88,88% (8/9)] e macrolídeos [*mdf(A)*] [100% (9/9)] . Genes de tolerância para metais pesados, arsênico (3/9), *telúrio* (4/9) e mercúrio (3/9), desinfetantes (9/9) e agrotóxicos (3/9) foram também preditos. Os plasmídeos identificados foram IncFIB-like [66,66% (6/9)], IncI1 [55,55% (5/9)], IncX1-like [33,33% (3/9)], IncB/O/K/Z-like [22,22% (2/9)], p011 [22,22% (2/9)], p0111-like [22,22% (2/9)], IncFIA, IncFII, IncY-like, IncX4-like, ColpVC, Col(pHAD28) e Col8282 (**Figura 3**).

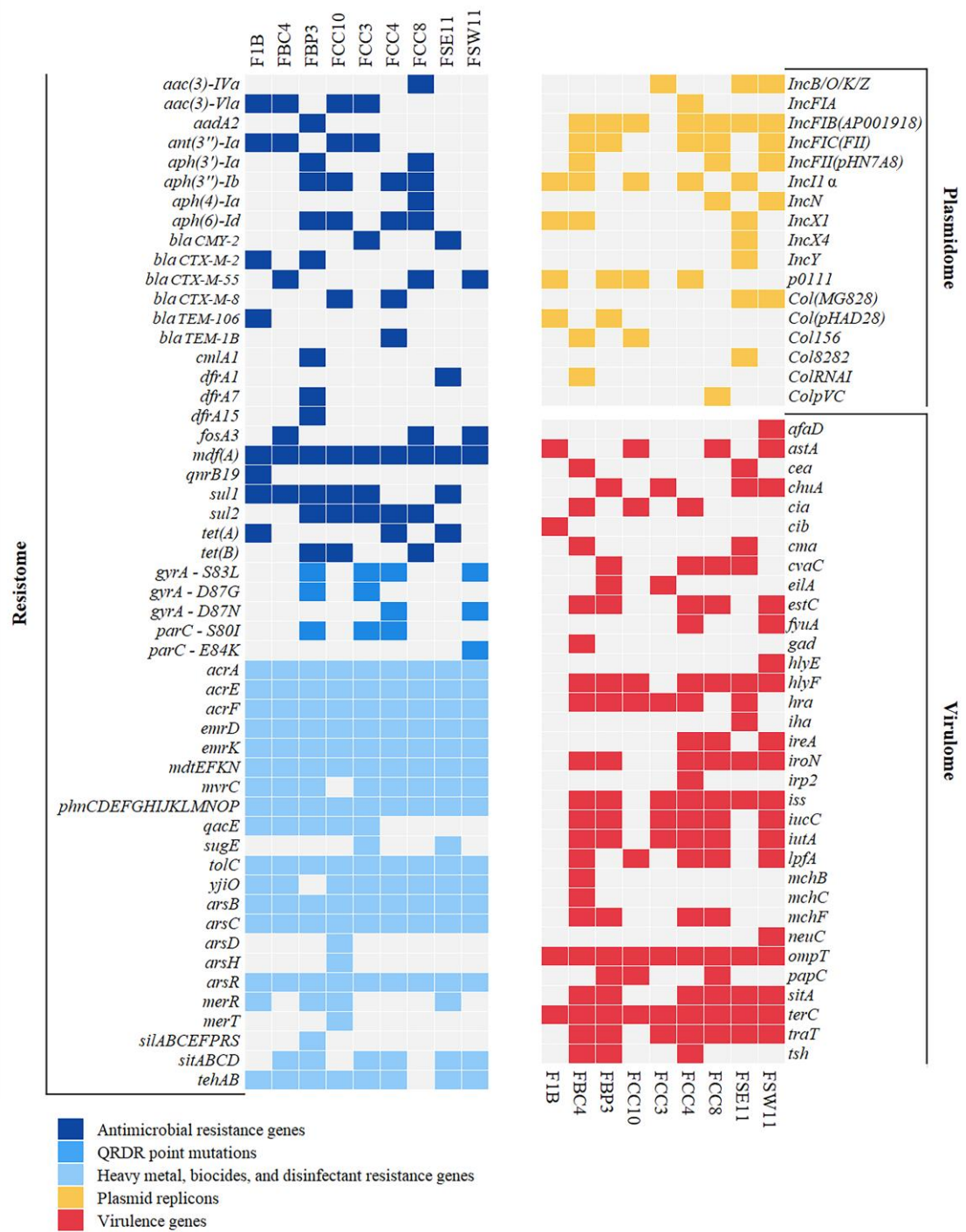


Figura 3. Heatmap de resistoma, viruloma e plasmidoma das cepas isoladas de CF

4.3 Filogenia

A cepa F1B (ST443) aproxima-se de isolados de gado da Tailândia e EUA, com contagem de SNP variando de 456 a 550 (**Figura 4**). A estirpe FBP3 (ST38) está próxima de cepas de origem alimentar como, carne de frango, isolados do Brasil e EUA, com contagem de SNP variando de 128 a 142 (**Figura 5**). A cepa FCC3 (ST350) é relativamente próxima de isolados de humanos, aves, gado e animais selvagens dos EUA e China, com contagens de SNP variando de 932 a 1294 (**Figura 6**).

A cepa FBC4 (ST2040) assemelha-se a isolados de aves dos EUA, com contagem de SNP variando de 45 a 70 (**Figura 7**). A cepa FCC4 (ST2179) mostrou-se distante de todos os outros isolados na análise, com as maiores contagens de SNP (entre 353 e 451). FCC4 estava em um clado com isolados de humanos e animais selvagens da Austrália (**Figura 8**).

A linhagem FCC8 (ST 3258) tinha apenas 18 conjuntos de genoma disponíveis, então todos os genomas foram usados. Utilizando-se o CSI Phylogeny v1.4 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny>), para gerar árvores de máxima probabilidade com base no alinhamento SNP. Dentre as cepas, mostrou maior distanciamento dos demais isolados na análise, aproximando-se de dois isolados de aves dos EUA, com contagens de SNP de 1416 e 1447 (**Figura 9**).

A análise filogenética da estirpe FCC10, cujo ST não foi encontrado, realizou-se uma investigação aprofundada nos alelos *adk* 9, *fumC* 6, *gyrB* 33, *icd* 131, *mdh* 24 e *purA* 8, deixando em branco o locus *recA*, visando encontrar cepas intimamente relacionadas, sendo assim aproximou-se das cepas de *E. coli* ST641 de origem animal e humana isoladas na África do Sul, Quênia, China e EUA, com contagem de SNP variando de 534 a 726 (**Figura 10**).

A cepa FSW11 (ST117) aproxima-se de outros CTS- *E. coli* ST117 produtora de M-55 isolada no Brasil em 2019, de origem suína e de aves, com contagens de SNP de 15 e 17, respectivamente (**Figura 11**). A cepa FSE11 (ST57) está intimamente relacionada com isolados de gado da Alemanha, EUA e Reino Unido, com contagem de SNP variando de 113 a 180 (**Figura 12**).

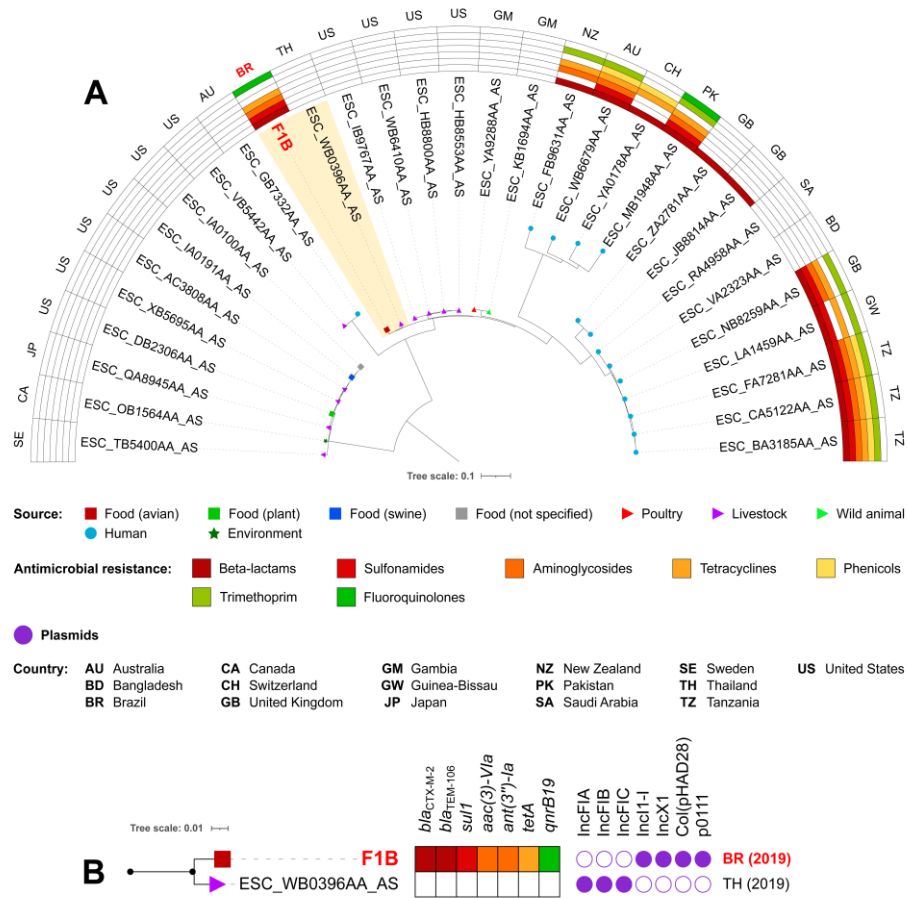


Figura 4. Árvore filogenética da estirpe F1B (ST443), isolada de CF de produção “antibiotic-free”.

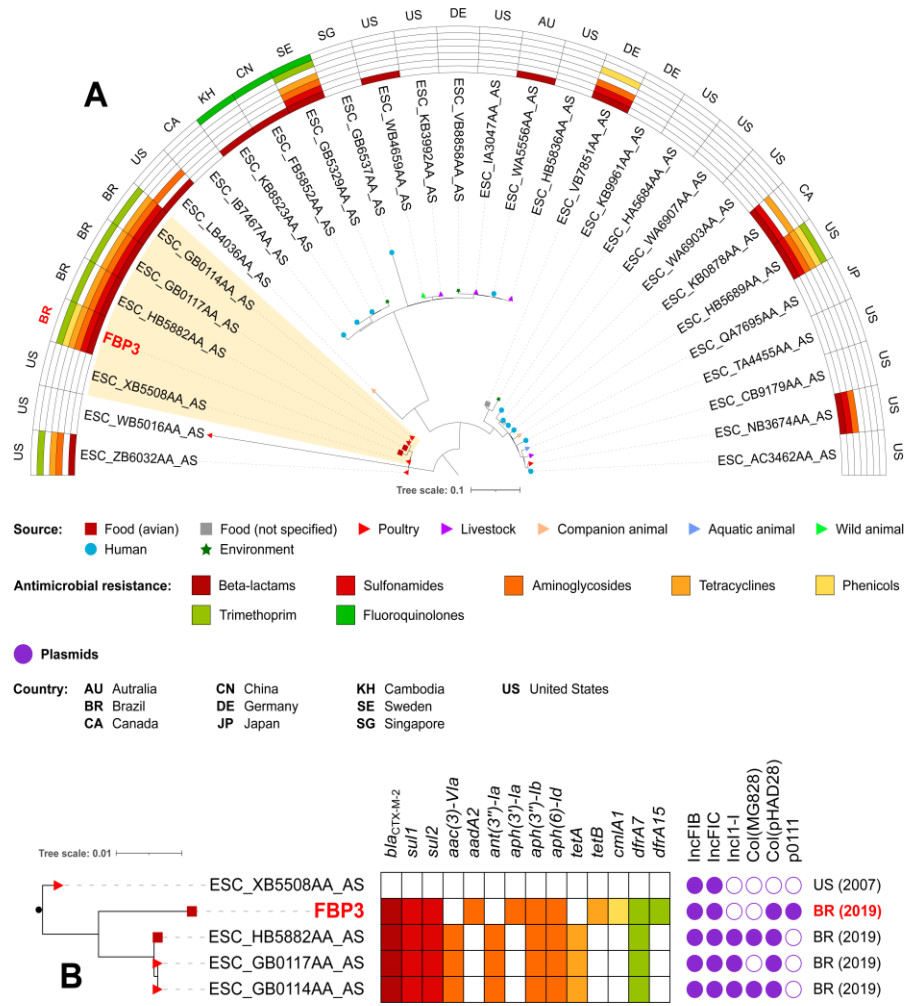


Figura 5. Árvore filogenética da estirpe FBP3 (ST38), isolada de CF de produção convencional.

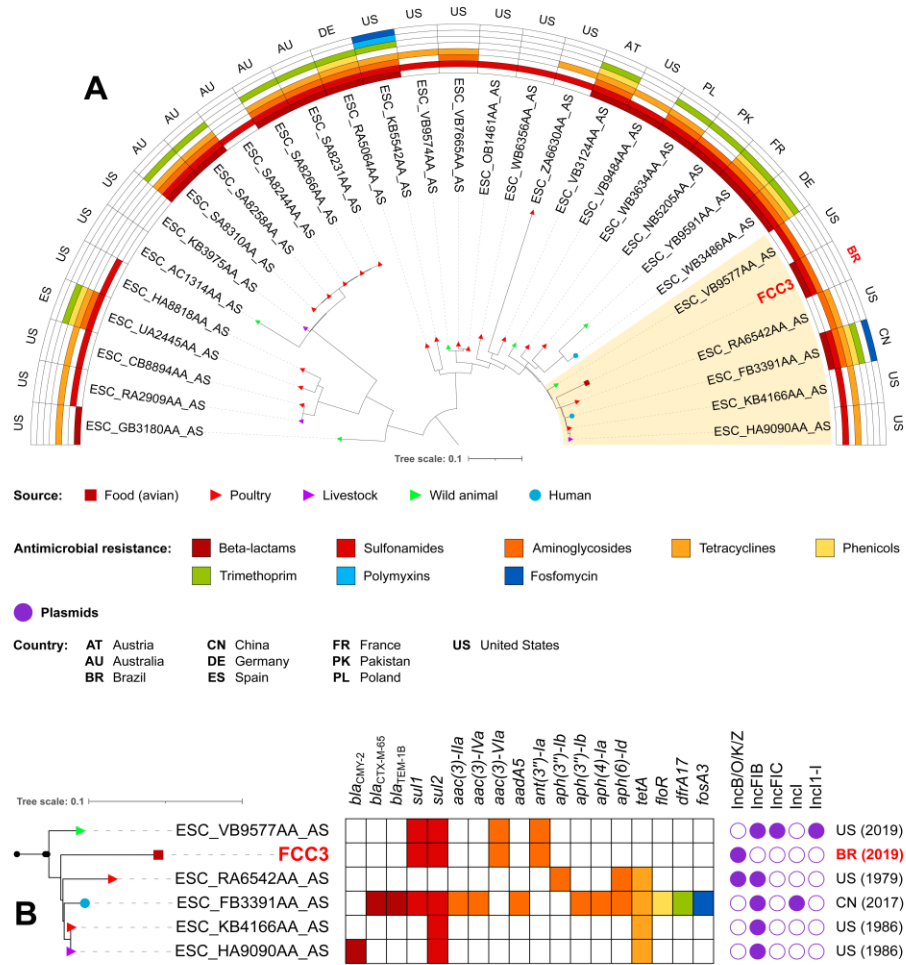


Figura 6. Árvore filogenética da estirpe FCC3 (ST350), isolada de CF de produção convencional.

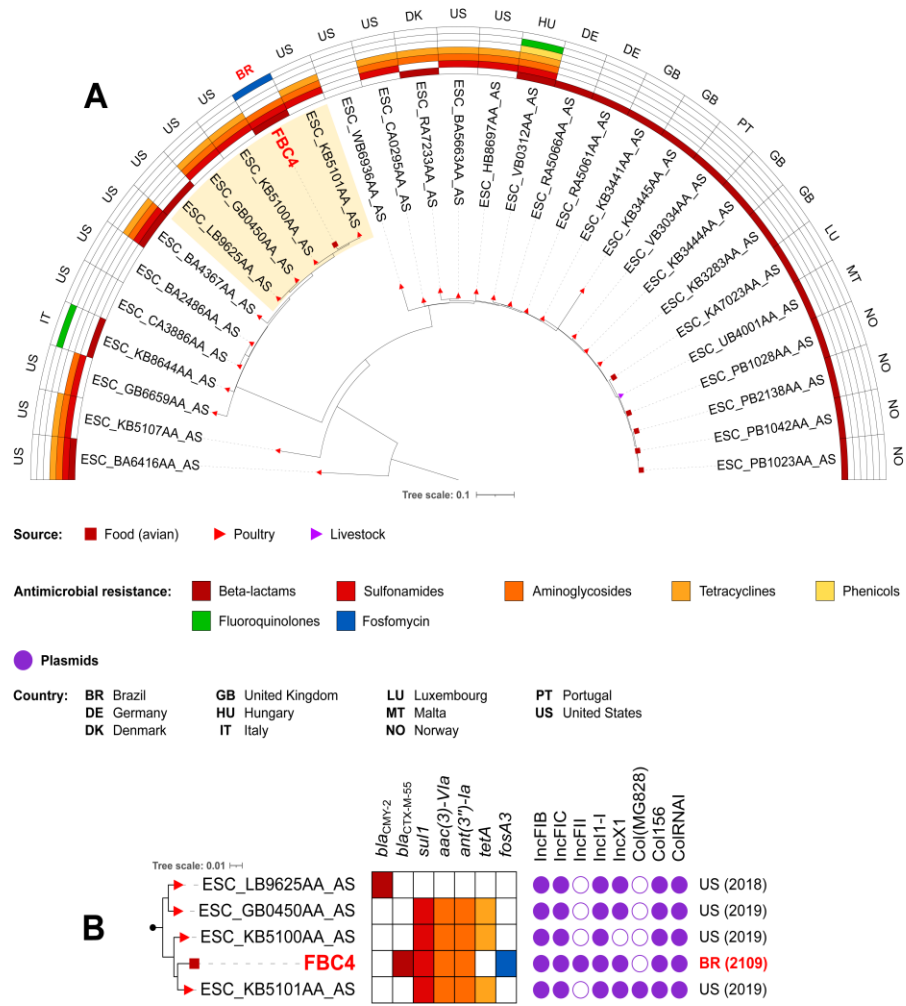


Figura 7. Árvore filogenética da estirpe FBC4 (ST2040), isolada de CF de produção convencional,

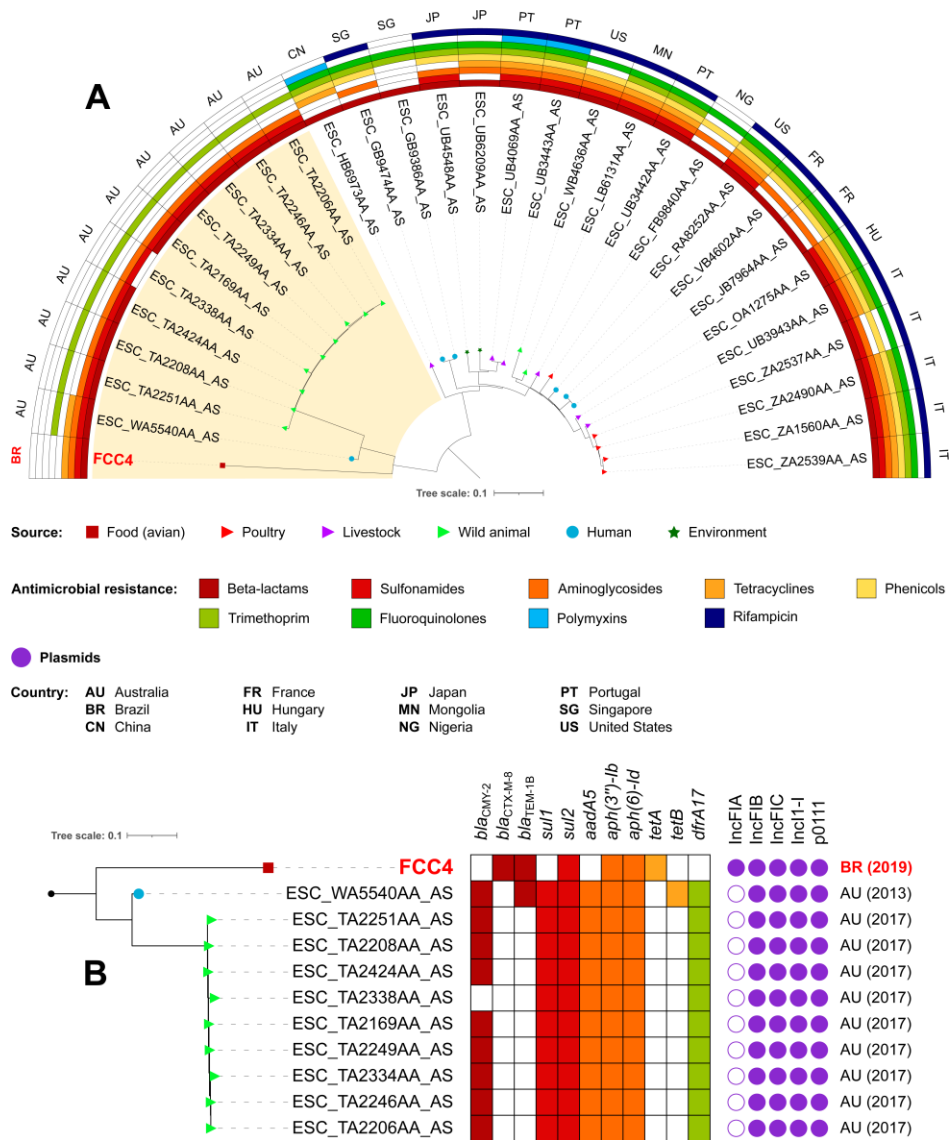


Figura 8. Árvore filogenética da estirpe FCC4 (ST2179), isolada de CF de produção convencional.

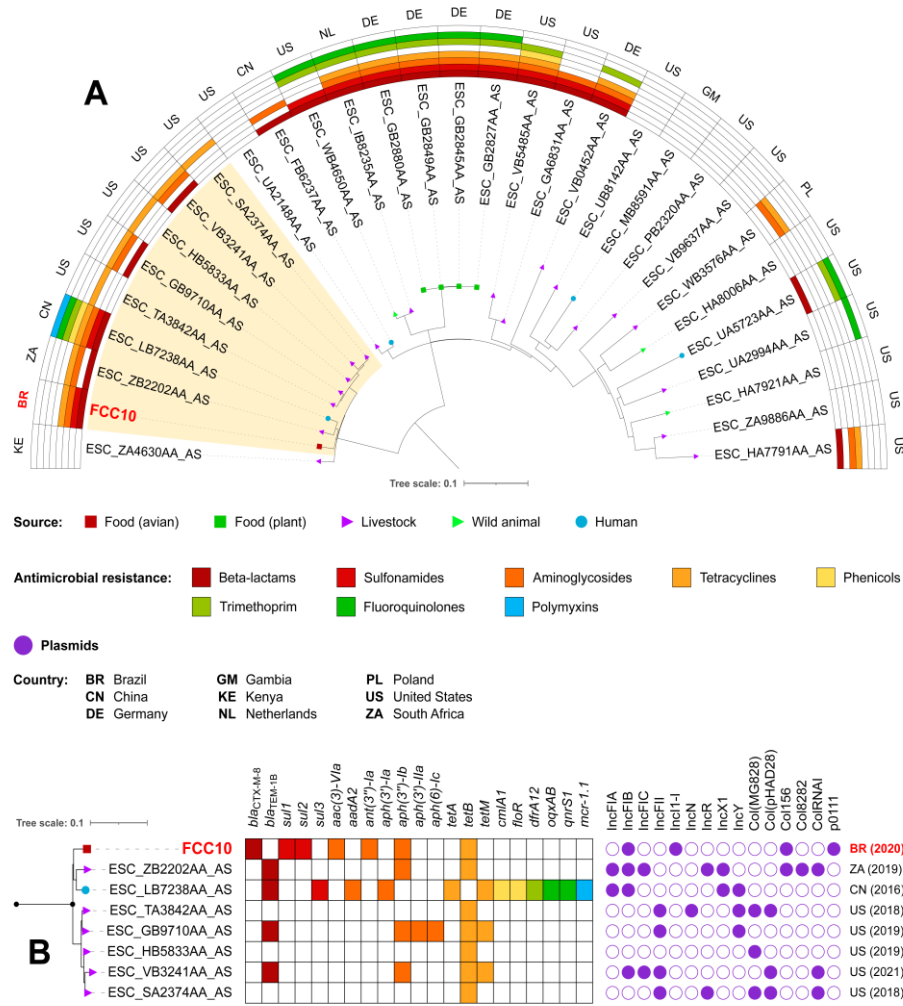


Figura 10. Árvore filogenética da estirpe FCC10 (ST641), isolada de CF de produção “antibiotic-free”

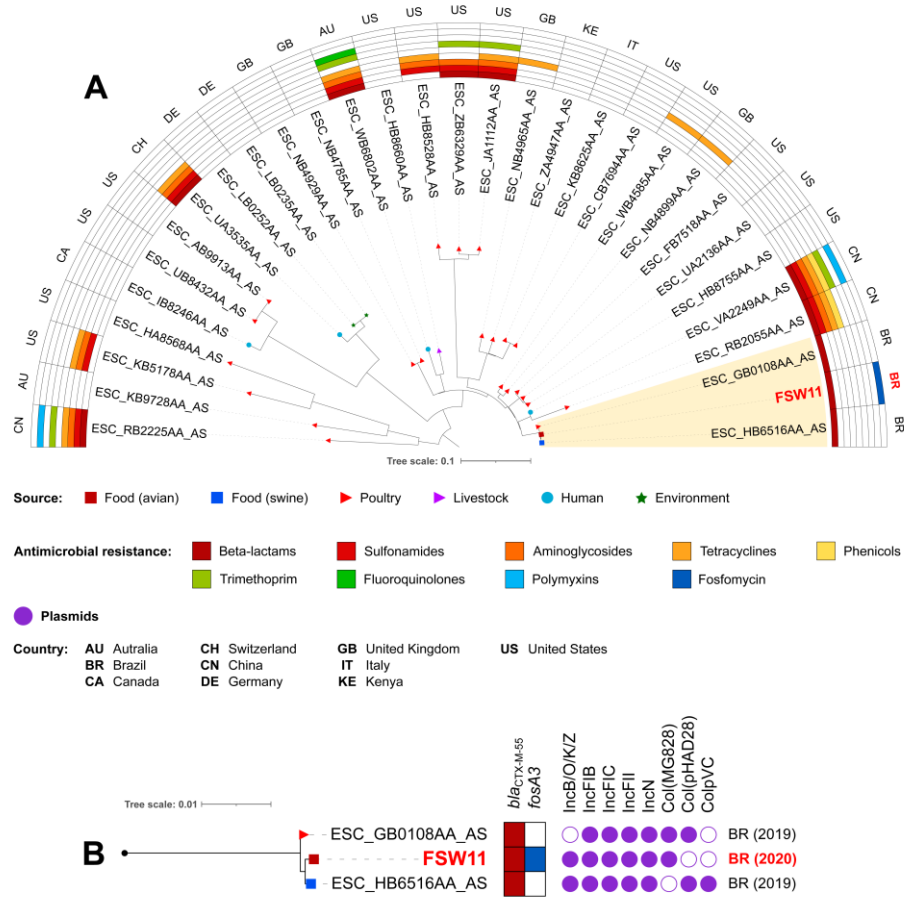


Figura 11. Árvore filogenética da estirpe FSW11(ST117), isolada de CF de produção “antibiotic-free”

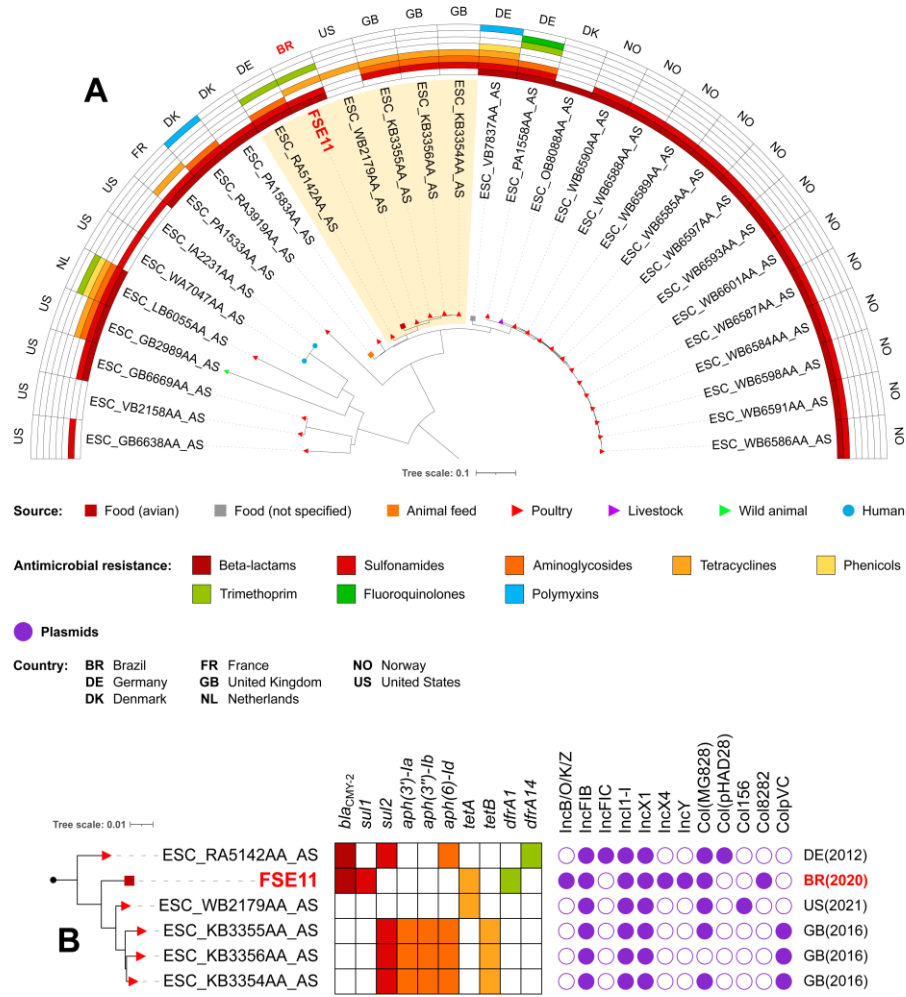


Figura 12. Árvore filogenética da estirpe FSE11 (ST57), isolada de CF de produção “antibiotic-free”

5 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, reportamos a presença de patógenos bacterianos MDR em 85,71% das amostras de carnes “*antibiotic-free*”. Considerando que o número de amostragem do nosso trabalho é pequeno e limita-se a cidade de São Paulo, observamos alta prevalência desses patógenos. Apesar das empresas produtoras de alimentos orgânicos e “*antibiotic-free*” mencionarem o não uso de antibióticos na sua produção animal, não podemos afirmar qual a origem dessas bactérias,

[Estudos vem mostrando a disseminação e distribuição mundial de bactérias MDR, oriundas de diversas origens, como meio ambiente, hospital, comunidade, animais de vida livre, animais de companhia, produção e alimentos. Com relação a alimentos, hipóteses têm sido discutidas como a possibilidade de ocorrer contaminação cruzada dentro de abatedouros ou em até mesmo granjas, a introdução de animais colonizados com bactérias MDR no plantel, ou ainda estar havendo o emprego de antibiótico em algum momento da cadeia de produção (ZHENGXIN et al, 2019; BUESS, et al, 2019). As rotas de transmissão de bactérias albergando genes de resistência entre alimentos e humanos não está clara, embora todas as estirpes isoladas em nosso estudo nenhuma apresentar o mesmo ST, já foram relatados em diversos países e diferentes origens. Entre os mais importantes, encontra-se o ST38 que é amplamente distribuído no mundo e foi reportado em infecções sanguíneas, urinárias e doenças do trato gastrointestinal.

Outro importante dado relatado em nosso trabalho e visto em outro trabalho realizado no sul do Brasil, são bactérias *E.coli* que albergavam o gene *bla*_{CTX-M-55} e gene de resistência à fosfomicina (*fosA3*) e essas bactérias foram identificadas em amostras de cama aviária e em insetos que vivem em granjas, dessa maneira tornando-os portadores ou reservatórios para a disseminação de MDR (GAZAL et al, 2021)..

Reportamos a presença do ST117, também considerado um ST emergente e oriundo de diversas origens, como carne de frango e peru e amostras de pacientes (PIETSCH et al, 2019; GAZAL et al, 2021)

6 CONCLUSÕES

Embora a amostragem do trabalho seja pequena, nosso estudo corrobora com as observações feitas por Cesare et al, 2022 e Li et al, 2020, demonstrando que não houve diferença entre o resistoma de bactérias MDR em carnes de produção convencional e produção “antibiotic-free”. Com relação aos pontos de colheita realizadas na cidade de São Paulo, não houve diferença entre as regiões, principalmente com relação a carnes vendidas no balcão.

Estudos vem sendo realizados com a finalidade de mitigar e elucidar rotas de transmissibilidade/disseminação de bactérias MDR, é importante pautarmos as questões higiênicas sanitárias dentro e fora das granjas, abatedouros, comércios que fracionam e realização a venda de alimentos de origem animal, manipuladores de alimentos. O controle do uso de antibióticos e medidas higiênicas podem colaborar para a diminuição desses patógenos que causam tantos prejuízos a saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ARAGÃO A. A., Contini E. Brasil é o quarto maior produtor de grãos e o maior exportador de carne bovina do mundo, diz estudo. **Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. 2020. p. 1–4.
- ANIMAL N e S. Pecuária intensiva e extensiva: conheça as diferenças [Internet]. Available from: <https://nutricaoesaudeanimal.com.br/pecuaria-intensiva-e-extensiva/>
- BANKEVICH A, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **J Comput Biol**. 2012;19(5):455–77.
- BASSI NSS, da SILVA CL. Oportunidades e desafios em pd&i na cadeia produtiva de frangos de corte. **Embrapa Suínos e Aves**. 2017;10(109):11. Available from: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1083087>
- BIOMÉRIEUX. Antimicrobial resistance in the environment : how does it spread ? - **AMR**. 2020. Available from: <https://amr.biomerieux.com/en/challenges/from-farm-to-food-to-people-one-health/>
- BRASIL. **Instrução Normativa Nº 1**, De 13 De Janeiro De 2020. Dou. 2020. p. 6. Available from: www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-1-de-13-de-janeiro-de-2020-239402385
- BUESS, S., et al. 2019. “Quantitative Microbiological Slaughter Process Analysis in a Large-Scale Swiss Poultry Abattoir.” **Food Control** 105 (May): 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.05.012>.
- CASELLA T., et al. Detection of blaCTX-M-type genes in complex class 1 integrons carried by Enterobacteriaceae isolated from retail chicken meat in Brazil. **Int Journal Food Microbiol**. 2015;197:88–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.001>
- CEPEA, PIB do Agronegócio Brasileiro [Internet]. 2022. Available from: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>
- CESARE, A. De, et al. 2022. “Pilot Study on Poultry Meat from Antibiotic Free and Conventional Farms: Can Metagenomics Detect Any Difference?” **Foods** 11 (3). <https://doi.org/10.3390/foods11030249>.

- DANTAS JP, FERREIRA HMN. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in cattle production – a threat around the world. **Heliyon**. 2020;6(1):e03206. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03206>
- DEBARATI, P, CHAKRABORTY R, Mandal SM. Biocides and health-care agents are more than just antibiotics: Inducing cross to co-resistance in microbes. **Ecotoxicol Environ Saf**. 2019;174 (November 2018):601–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.083>
- EJAZ H, et al. Molecular analysis of blaSHV, blaTEM, and blaCTX-M in extended-spectrum β -lactamase producing enterobacteriaceae recovered from fecal specimens of animals. **PLoS One**. 2021;16(1 January):1–15.
- FDA. Food and Drug Administration Revised Guidelines for the Assessment of Microbiological Quality of Processed Foods Salmonella , Campylobacter , Escherichia coli. FDA. 2021;
- FERNANDES MR, et al. Silent dissemination of colistin-resistant Escherichia coli in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene. **Eurosurveillance**. 2016;21(17):1–6.
- FERREIRA JC, et al. Evaluation and characterization of plasmids carrying CTX-M genes in a non-clonal population of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from poultry in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis** 2016;85(4):444–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.011>
- FETAHAGIĆ M, et al. Detection and characterisation of extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC β -lactamase produced by Escherichia coli isolates found at poultry farms in Bosnia and Herzegovina. **Arh Hig Rada Toksikol**. 2021;72(4):305–14.
- FGV. O Setor de Carnes no Brasil e Duas. **Anufood Brazil**, 2018. Available from: https://gvagro.fgv.br/sites/gvagro.fgv.br/files/u115/03_Setor_Carnes_Brasil_PT.pdf.
- GAZAL Le de S, et al. Detection of ESBL/AmpC-Producing and Fosfomicin-Resistant Escherichia coli From Different Sources in Poultry Production in Southern Brazil. **Front Microbiol**. 2021;11(January):1–11.
- GUIMARÃES DO, DA SILVA M. L, PUPO MT. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim Nova**. 2010;33(3):667–79.
- INÁCIO MCP, et al. Sistema Intensivo X Extensivo Na Criação De Gado De Corte.

- Rev Da Univ Val Do Rio Verde.** 2018;16(1):1–9.
- ITIE (Iniciativa de Transparência na Indústria Extrativa em Moçambique). 8º Relatório Anos de 2017 e 2018. 2020;
- IWU CD, KORSTEN L, OKOH AI. The incidence of antibiotic resistance within and beyond the agricultural ecosystem: A concern for public health. **Microbiologyopen.** 2020;9(9):1–28.
- LI, S., et al. 2020. “Microbiome-Informed Food Safety and Quality: Longitudinal Consistency and Cross-Sectional Distinctiveness of Retail Chicken Breast Microbiomes.” **MSystems** 5 (5): 1–21. <https://doi.org/10.1128/msystems.00589-20>.
- LIU YY, 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.** 2016;16(2):161–8.
- MANYI-LOH C, et al. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential public health implications. **Molecules.** 2018 Mar 30;23(4):795. doi: 10.3390/molecules23040795. PMID: 29601469; PMCID: PMC6017557.
- MCDONALD KL, et al. Measures used to assess the burden of ESBL-producing *Escherichia coli* infections in humans: a scoping review **JAC-Antimicrobial Resistance**, Volume 3, Issue 1, March 2021, dlaa104, <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlaa104>
- MENDONÇA J, et al. New CTX-M Group Conferring β -Lactam Resistance: A Compendium of Phylogenetic Insights from Biochemical, Molecular, and Structural Biology. **Biology** (Basel). 2022;11(2).
- MONTE DF, et al. Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying *mcr-1* genes in South America. **Antimicrob Agents Chemother.** 2017;61(5):2–5.
- MOURA Q, et al. Virulent nontyphoidal *Salmonella* producing CTX-M and CMY-2 β -lactamases from livestock, food and human infection, Brazil. **Virulence.** . 2018 Jan 1;9(1):281-286. doi: 10.1080/21505594.2017.1279779. Epub 2017 Feb 16. PMID: 28102761; PMCID: PMC5955470.
- MOSTAFA HH, et al. Genomic Surveillance of Ceftriaxone-Resistant *Escherichia coli* in Western New York Suggests the Extended-Spectrum β -Lactamase blaCTX-M-

- 27 Is Emerging on Distinct Plasmids in ST38. **Front Microbiol.** 2020;11(July).
- ONU. Doenças resistentes a medicamentos poderão causar 10 milhões de mortes por ano no mundo [Internet]. **Organização das Nações Unidas.** 2019. p. 10–3. Available from: <https://nacoesunidas.org/>
- PIETSCH M. et al. Whole genome analyses of CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food in Germany. **BMC Genomics.** 2018;19(1):1–17.
- THANTHIRIGE P, SHANAKA R, Of A, Contributing F, Time TO, Of O, et al. Instrução Normativa N^a 45. 2016;4–5. Available from: http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro_ged/pdf/2489_GED.pdf
- VACCINAR, Duarte KF. Panorama do uso de antibióticos na nutrição animal. [Internet]. 2020. Available from: <https://nutricaoesaudeanimal.com.br/uso-de-antibioticos-na-nutricao-animal/>
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO [Internet]. 2017. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- ZHENGXIN Ma, et al. 2019. “Mitigating Antibiotic Resistance at the Livestock-Environment Interface: A Review.” **Journal of Microbiology and Biotechnology** 29 (11): 1683–92. <https://doi.org/10.4014/jmb.1907.07011>.