

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**PREVALÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA EM ISOLADOS DE *E. coli*
PROVENIENTES DE FRANGOS DE CORTE**

SILVIA ADRIANA MAYER LENTZ

Orientadora: Prof.^a Dr^a Andreza Francisco Martins

Co-orientadora: Prof.^a Dr^a Amanda de Souza da Motta

Porto Alegre

Março/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**PREVALÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA EM ISOLADOS DE *E. coli*
PROVENIENTES DE FRANGOS DE CORTE**

Silvia Adriana Mayer Lentz
Médica Veterinária

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia
Ambiental

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Andreza Francisco Martins

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Amanda de Souza da Motta

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Março/2017

CIP - Catalogação na Publicação

Lentz, Silvia Adriana Mayer
PREVALÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA EM ISOLADOS
DE E. coli PROVENIENTES DE FRANGOS DE CORTE / Silvia
Adriana Mayer Lentz. -- 2017.
83 f.

Orientadora: Andreza Francisco Martins.
Coorientadora: Amanda de Souza Motta.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Resistência antimicrobiana. 2. ESBL. 3. MCR-1.
4. Escherichia coli. 5. Frango. I. Martins, Andreza
Francisco, orient. II. Motta, Amanda de Souza,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“A educação é a arma mais poderosa que você
pode usar para mudar o mundo.”
(Nelson Mandela)

AGRADECIMENTOS

Meus profundos e sinceros agradecimentos à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Andreza Francisco Martins, que foi muito mais que uma mestre na arte de ensinar. Agradeço por todas as transformações que este trabalho me proporcionou e pela imensa oportunidade recebida.

Às Médicas Veterinárias: Paula Marques Rivas e Sara Neves Souza pela amizade e parceria na realização deste trabalho, que acompanharam-me em todas as viagens e coletas, sem vocês este desenvolvimento científico não teria sido possível.

Ao Prof. Dr. Afonso Luís Barth pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa do Laboratório de Resistência Bacteriana (LABRESIS) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que através do qual pude enriquecer meus conhecimentos, desenvolver boa parte deste projeto e ter a oportunidade de aprender com este grande pesquisador.

À minha co-orientadora Médica Veterinária, Prof.^a Dr.^a Amanda de Souza da Motta, pela parceria realizada para o acontecimento deste trabalho, auxiliando-me e acompanhando-me inclusive nas coletas.

Às bolsistas de iniciação científica Victória Martins Lima Cupertino e Franciele Caroline Adam, que me auxiliaram nas mais diversas etapas deste trabalho.

À Daiana de Lima Morales, pós-doutoranda do LABRESIS, pela colaboração, parceria, ensinamentos e todos auxílios prestados neste projeto.

À doutoranda Tanise Vendruscolo Dalmolin, por toda colaboração, auxílio e amizade.

À UFRGS que me proporcionou suporte em todas as etapas, inclusive na divulgação do conhecimento produzido a outros países.

À mestranda Laísa Borges Ferreira, pela amizade, auxílio e colaboração neste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento deste projeto.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Ao meu amor Evandro, por todo suporte, apoio e compreensão.

A todos, meu muito obrigada!

PREVALÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA EM ISOLADOS DE *E. coli* PROVENIENTES DE FRANGOS DE CORTE

Autor: Sílvia Adriana Mayer Lentz
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andreza Francisco Martins
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Amanda de Souza da Motta

RESUMO

A resistência antimicrobiana é um desafio atual à saúde pública. Agentes antimicrobianos são indispensáveis no controle de infecções bacterianas, não só em seres humanos, mas também em animais e plantas. A pressão seletiva imposta pela utilização sistemática de um antimicrobiano pode selecionar cepas com algum mecanismo de resistência e estas, disseminarem-se pelo ambiente. Muitas teorias e controvérsias existem a respeito da disseminação da resistência entre animais e humanos, além disso, a prevalência de genes que conferem resistência às cefalosporinas de espectro estendido, carbapenêmicos e colistina, em bactérias zoonóticas comensais é pouco conhecida. Este trabalho avaliou a prevalência dos principais genes de resistência de importância clínica (*bla*_{IMP}-type, *bla*_{VIM}-type, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}-type, *bla*_{GES}-type, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *mcr-1*) em isolados de *E. coli*, originados de aves de produção. Foram coletados swab cloacal de frangos, em um abatedouro frigorífico localizado no Rio Grande do Sul. Foram obtidos 343 isolados de *E. coli* que cresceram em presença de ceftazidima. Entretanto, 57 isolados foram positivos para os genes que conferem resistência às cefalosporinas: 3 *bla*_{SHV}, 18 *bla*_{CTX-M}, 30 *bla*_{TEM} e 6 para *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM} concomitantemente. Destes, 25 isolados foram positivos no teste fenotípico para pesquisa de ESBL. De acordo com o perfil de susceptibilidade aos antibióticos, 56 (98%) isolados foram considerados multirresistentes. Quanto à pesquisa do gene *mcr-1*, 10 isolados foram positivos (2,9%), sendo todos multirresistentes. Destes, 8 obtiveram valor de CIM para polimixina de 2mg/L, os outros dois isolados obtiveram CIM 0.25mg/L e 1mg/L. A tipagem molecular realizada por PFGE demonstrou que 5 isolados do mesmo lote foram clonalmente relacionados, enquanto outros 5 não tiveram relação clonal. A tipagem molecular realizada *in silico* a partir do sequenciamento completo do genoma bacteriano de 4 isolados positivos para o gene *mcr-1* revelou a presença de 3 STs: ST38, ST58 e ST2491. A ST38 é bastante disseminada e associada com infecções em humanos. Diante da emergência da propagação do gene *mcr-1* a partir de bactérias comensais de animais, torna-se crucial a implementação de práticas interdisciplinares no controle do uso de antimicrobianos na medicina veterinária, humana e no ambiente, evitando a disseminação da resistência e o esgotamento das opções terapêuticas. Alternativas ao uso indiscriminado dos antibióticos na produção animal junto a ações que procurem diminuir o potencial reservatório ambiental destes genes, devem ser implementadas.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (83 p.) Março, 2017.

PREVALENCE OF RESISTANCE GENES IN *E. coli* ISOLATED FROM BROILER CHICKENS

Author: Silvia Adriana Mayer Lentz
Advisor: Prof. Dr. Andreza Francisco Martins
Co-Advisor: Prof. Dr. Amanda de Souza da Motta

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a current public health challenge. Antimicrobial agents are essential in the control of bacterial infections, not only in humans, but also in animals and plants. The pressure selection imposed by the systematic use of an antimicrobial, selects strains that harbor some resistance mechanism. The antibiotic resistance spread among animals and humans is controversial, furthermore, the prevalence of genes related to resistance to extended-spectrum cephalosporins, carbapenems and colistin in zoonotic commensal bacteria is not completely known. This study evaluated the prevalence of important clinical resistance genes (*bla*_{IMP}-type, *bla*_{VIM}-type, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}-type, *bla*_{GES}-type, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} and *mcr-1*) in *E. coli* isolates originated from poultry production. Cloacal swabs were collected from chickens in a slaughterhouse located in Rio Grande do Sul. A total of 343 *E. coli* isolates were grown in the presence of ceftazidime. Genes encoding resistance to carbapenems, were not detected. However, 57 isolates were positive to cephalosporins resistance genes: 3 *bla*_{SHV}, 18 *bla*_{CTX-M}, 30 *bla*_{TEM} and six isolates were co-producers of *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM}. Phenotypic test for confirmation of ESBL, were positive for 25 isolates. According to the profile of susceptibility to antibiotics, 56 isolates were considered multiresistant (98%). Regarding the *mcr-1* gene investigation, 10 isolates were positive, all of them multiresistant. The polymixin MIC of 8 isolates was 2 mg/L, the other two isolates presented MIC = 0.25mg/L and MIC = 1 mg/L. The molecular typing analysis, performed by PFGE, showed that 5 isolates from the same batch were clonally related, while another 5 were not related. Molecular typing performed *in silico* from complete sequencing of the bacterial genome of 4 *mcr-1* positive isolates revealed the presence of 3 sequences type: ST38, ST58 e ST2491. With the present data in our hands and the emergence of *mcr-1* gene, detected in commensal bacteria, with animal origins, it is crucial to implement interdisciplinary practices, to control the use of antimicrobials in veterinary medicine, human and the environment, avoiding the spread of resistance and depletion of therapeutic options. The indiscriminate use of antibiotics in animal production should be re-consider, as well as actions aiming to reduce the potential environmental reservoir of resistance genes, in order to prevent global spread.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (83 p.) March, 2017.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1	Produção de frangos no Brasil	5
2.2	Uso de antimicrobianos na avicultura	5
2.2.1	<i>Antimicrobianos administrados aos animais</i>	7
2.3	Família Enterobacteriaceae	9
2.3.1	<i>Escherichia coli</i>	10
2.4	Resistência antimicrobiana no contexto atual	12
2.5	Reservatórios ambientais de genes de resistência	12
2.6	Bases genéticas de resistência aos antibióticos	14
2.7	Mecanismos de resistência em bactérias Gram-negativas	15
2.7.1	<i>Resistência aos β-lactâmicos</i>	15
2.7.1.1	Carbapenemases.....	18
2.7.2	<i>Resistência às polimixinas</i>	20
3.	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	Coleta e transporte das amostras	23
4.2	Processamento das amostras	24
4.3	Identificação de <i>Escherichia coli</i>	25
4.4	Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	25
4.4.1	<i>Avaliação do perfil de susceptibilidade à polimixina</i>	26
4.5	Extrações de DNA para pesquisa genotípica	26
4.6	Teste genotípico para pesquisa de <i>mcr-1</i>	26
4.6.1	<i>Conjugação bacteriana</i>	27
4.7	Pesquisa de ESBL fenotípica e genotípica	28
4.7.1	<i>Pesquisa de ESBL genotípica</i>	28
4.7.1.1	Pesquisa SHV.....	29
4.7.1.2	Pesquisa TEM e CTX-M.....	29
4.8	Detecção dos produtos de PCR	31

4.9	Testes genotípicos para pesquisa de carbapenemases.....	31
4.10	Macrorestrição do DNA e eletroforese em gel de campo pulsado.....	31
4.11	Sequenciamento completo do genoma.....	33
5.	ASPECTOS ÉTICOS.....	34
6.	RESULTADOS.....	35
6.1	Avaliação do consumo de antimicrobianos.....	35
6.2	Pesquisa genotípica e fenotípica de ESBLs.....	36
6.3	Pesquisa genotípica de <i>mcr-1</i> e perfil de susceptibilidade às polimixinas.....	39
6.4	Tipagem molecular.....	42
6.5	Sequenciamento completo do genoma.....	44
6.6	Pesquisa genotípica de resistência aos carbapenêmicos.....	44
7.	DISCUSSÃO.....	44
8.	CONCLUSÕES.....	50
9.	REFERÊNCIAS.....	51
	ANEXO A.....	66
	ANEXO B.....	68
	ANEXO C.....	69

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Principais β -lactamases de importância clínica.	17
Tabela 2. <i>Primers</i> e condições de PCR utilizadas para a pesquisa dos genes: <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{IMP} -type, <i>bla</i> _{VIM} -type, <i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{KPC} -type, <i>bla</i> _{GES} -type, <i>bla</i> _{OXA-48} , e <i>mcr-1</i> .	30
Tabela 3. Informações dos Boletins Sanitários referente ao uso de antimicrobianos dos animais em estudo.	35
Tabela 4. Características dos isolados positivos para os genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{CTX-M} .	38
Tabela 5. Características dos isolados de <i>E. coli</i> positivos para <i>mcr-1</i> .	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Demonstração dos diferentes ecossistemas envolvidos na disseminação da resistência.	2
Figura 2. Disseminação de <i>E. coli</i> entre os diferentes habitats.	11
Figura 3. Distribuição geográfica do gene <i>mcr-1</i> no mundo.	22
Figura 4. Representação esquemática da montagem do teste fenotípico para pesquisa de ESBL pelo método de disco combinado.	28
Figura 5. Fluxograma relativo aos testes realizados com as amostras.	34
Figura 6. Gel de agarose do resultado do PCR para o gene <i>bla_{CTX-M}</i> após a realização do <i>screening</i> com <i>pool</i> de amostras.	36
Figura 7. Gel de agarose do resultado do PCR realizado com as amostras individuais para os genes <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> e <i>bla_{TEM}</i> .	36
Figura 8. PFGE dos 10 isolados positivos para o gene <i>mcr-1</i> .	42
Figura 9. Dendrograma dos isolados de <i>E. coli</i> positivos para o gene <i>mcr-1</i> . A análise foi feita através do método de agrupamento usando média aritmética não-ponderada (UPGMA). Similaridade Genética foi calculada pelo coeficiente de Dice. Cut-off de 80% de similaridade foi usado para definição dos Grupos clonais (linha).	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BGN	Bacilo Gram-negativo
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ESBL	β -lactamase de espectro estendido (<i>Extended-Spectrum β-Lactamase</i>)
EUA	Estados Unidos da América
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
GES	Guiana Extended-Spectrum β -Lactamase
IMP	Imipenemase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDM	New Delhi Metallo- β -Lactamase
OIE	Organização Internacional de Epizootias
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXA	Oxacilinase
PBP	Proteína de Ligação das Penicilinas (<i>Penicillin Binding Protein</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
PIB	Produto Interno Bruto
TBE	Tampão Tris-borato-EDTA
U	Unidade

UFC *Unidade Formadora de Colônia*
USDA *United States Department of Agriculture*
USFDA *United States Food and Drug Administration*
VIM *Verona Integron-Mediated Metallo- β -Lactamase*
WHO *World Health Organization*
 μg *Micrograma*
 μL *Microlitro*

1. INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana em bactérias tornou-se um importante problema de saúde pública. Agentes antimicrobianos são indispensáveis no controle de infecções bacterianas, não só em seres humanos, como também em animais e plantas. A utilização sistemática de um antimicrobiano seleciona bactérias com concentrações inibitórias mínimas mais elevadas e sob a pressão seletiva imposta pelo seu uso, as cepas mais resistentes podem multiplicar-se e expandir-se em detrimento de outras que são inibidas pelo respectivo agente (BUTAYE et al., 2014).

As bactérias podem transferir genes de resistência a outras bactérias horizontalmente e deste modo, contribuir para a disseminação de genes de resistência dentro das populações bacterianas de diferentes ecossistemas. Em ambientes com múltiplos microrganismos, estes processos de transferência de genes podem envolver doadores e receptores que pertencem a diferentes espécies e gêneros. Isto não se aplica somente às bactérias de origem humana, mas também as de origem animal e ambiental – uma situação que se reflete no conceito "One Health " (BUTAYE et al., 2014).

Para combater a ameaça à saúde humana, uma investigação multidisciplinar é imprescindível. Cuidados de saúde, agricultura, e ambiente devem estar interligados, conscientes dos potenciais resultados não intencionais, ações integradas e inteligentes são necessárias para garantir o acesso sustentado para agentes antimicrobianos eficazes.

O conceito "One Health", consiste numa estratégia mundial adotada pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) que tem como objetivo a colaboração interdisciplinar entre entidades e/ou organismos de todos os temas relacionados com a saúde das pessoas e animais. Sua importância reside no fato de que a grande maioria das doenças infecciosas emergentes são zoonoses (CONRAD; MEEK; DUMIT, 2013).

A aplicação do conceito "One Health" baseia-se em práticas corretas relacionadas com a prevenção, vigilância e detecção de doenças animais (incluindo as zoonoses), assim como a notificação dessas situações e a determinação de respostas rápidas e eficazes. Isso inclui ainda outras aplicações diretamente relacionadas com a inocuidade dos alimentos e segurança alimentar de forma a promover uma proteção eficaz da saúde pública (CDC, 2015).

O plano de ação global sobre resistência antimicrobiana publicado em 2015 traz a necessidade de engajamento da sociedade na saúde única, especialmente quando o assunto é resistência a antibióticos (WHO, 2015).

Dada a disseminação da resistência no mundo, diversos esforços têm sido realizados para demonstrar a ligação existente entre o consumo de antimicrobianos na alimentação animal e a presença de genes de resistência no ambiente.

O uso indiscriminado de antibióticos como promotores de crescimento animal e a falta de programas eficientes de vigilância por parte dos órgãos de saúde pública são um grande obstáculo na prevenção da disseminação da resistência microbiana (EFSA, 2013; FISCHER et al., 2012; GUERRA; FISCHER; HELMUTH, 2014; POIREL et al., 2012; WANG; et al., 2012; WOODFORD et al., 2014; ZHANG et al., 2013).

Neste contexto, as enterobactérias são muito importantes, pois fazem parte da microbiota animal e humana, além de poderem ser encontradas no solo e nos alimentos, estabelecendo um ciclo de contato entre os diferentes componentes do ecossistema (Figura 1).

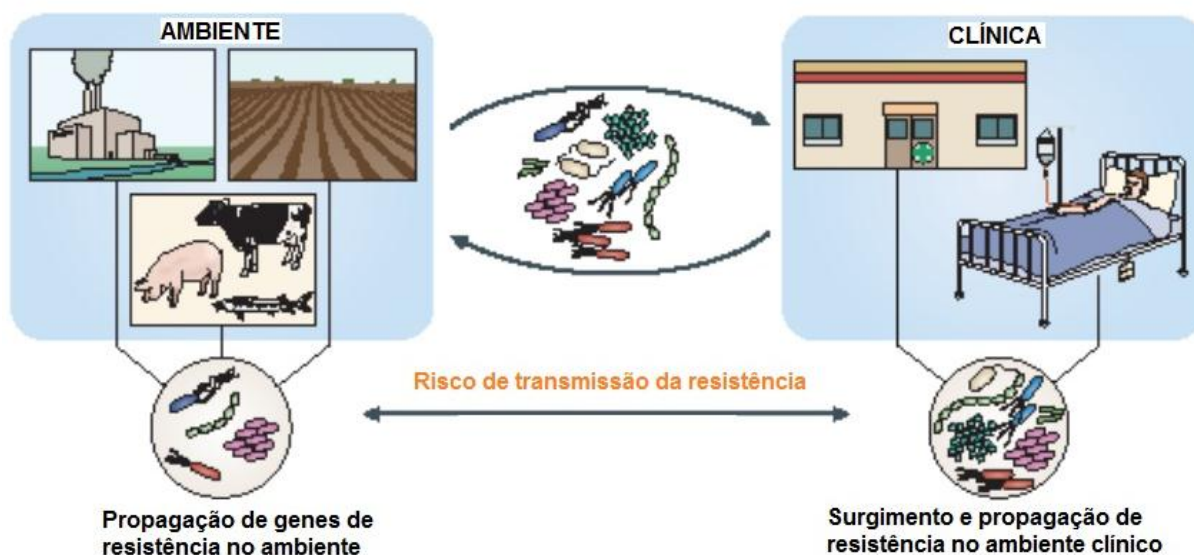


Figura 1. Demonstração dos diferentes ecossistemas envolvidos na disseminação da resistência.^a

^aAdaptado de BERENDONK et al., 2015.

A *Escherichia coli* é uma enterobactéria colonizante do trato gastrointestinal de humanos e animais, mas também é um microrganismo extremamente versátil,

podendo se tornar um patógeno frequentemente fatal quando causa infecções como meningites, por exemplo. É capaz de sobreviver em diferentes ambientes, e carrear elementos genéticos móveis que lhe conferem vantagem adaptativa. A resistência antimicrobiana é bastante estudada e importante nesta espécie, uma vez que ela interliga, humanos, ambiente e animais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Diversos mecanismos de resistência têm sido identificados em enterobactérias, mas a resistência aos β -lactâmicos mediada por enzimas é um dos mais importantes. Entre esses mecanismos, podemos citar as β -lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) - que degradam penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos - são mediadas por genes plasmidiais não induzíveis e foram inicialmente isoladas de pacientes hospitalizados, mas posteriormente encontradas em pacientes da comunidade e são preocupação atualmente junto aos animais de produção e de companhia (ARPIN et al., 2003; CHONG et al., 2013; EMERY; WEYMOUTH, 1997; KIRATISIN; HENPRASERT, 2011; LEE et al., 2013; LUZZARO et al., 2006; MARCHANDIN et al., 1999; MINARINI et al., 2007; NEDJAI et al., 2012; PENA et al., 1998; RODRIGUEZ-BANO et al., 2004; TOFTELAND et al., 2012).

Escherichia coli produtora de ESBL já foi amplamente descrita no ambiente hospitalar e ambientes rurais (EDELSTEIN et al., 2003; SMET et al., 2008). Gao e colaboradores afirmam que a *E. coli* produtora de ESBL é normalmente considerada um indicador bacteriano para rastreamento da propagação dos genes de resistência a estes antibióticos (GAO et al., 2015). Diversas pesquisas estão sendo realizadas para avaliar a ocorrência e propagação dos genes de resistência de ESBL em ambientes hospitalares, estações de tratamento de águas residuais, corpos d'água, e animais produtores de alimentos (AGERSO et al., 2012; BLAAK et al., 2014; EDELSTEIN et al., 2003).

Três famílias de ESBLs são importantes por estarem presentes em espécies bacterianas que colonizam e infectam os animais e o homem: a enzima denominada TEM (que foi assim nomeada em referência ao paciente Temoneira), a SHV (variável reagente sulfidrílica) e CTX-M (que possui afinidade pela cefotaxima, isolado pela primeira vez em Munique). Além das ESBLs, destacamos genes que codificam as carbapenemases que também estão presentes em importantes reservatórios como hospitais, meio ambiente, animais silvestres, domésticos e em

animais de produção (GUERRA; FISCHER; HELMUTH, 2014).

Bactérias da família Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases têm sido implicadas em surtos de infecções hospitalares em vários países. A presença destas bactérias em animais produtores de alimentos e no ambiente tem sido demonstrada, embora ainda careçam estudos nesta área (CANTON et al., 2012; GRUNDMANN et al., 2010; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

Carbapenêmicos são considerados a melhor opção terapêutica ao tratamento de infecções graves causadas por bacilos gram-negativos. Entretanto, as carbapenemases tem impactado significativamente na saúde humana, devido ao seu mecanismo de resistência a estes antimicrobianos (hidrolisando não só esta classe de antibióticos mas também outros β -lactâmicos como as cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos), a presença de seus genes localizados em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons, e sua rápida disseminação em âmbito mundial, vem sendo considerada um emergente problema de saúde pública (BRASIL, 2013).

O último recurso para o tratamento de infecções causadas por Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases são as Polimixinas. Contudo, a recente identificação do gene *mcr-1* plasmidial que confere resistência às polimixinas, causou grande alerta à saúde pública. O gene *mcr-1* foi descrito pela primeira vez na China em 2015 e, até agora existem relatos de sua ocorrência em todos os continentes (SCHWARZ; JOHNSON, 2016).

Com o aparecimento do gene *mcr* e a sua observação mais frequente em animais e alimentos de origem animal, a ideia de que a utilização dos melhoradores de desempenho tem favorecido a pressão seletiva exercida no ambiente e a disseminação da resistência, a exemplo da colistina, ganhou força. O que vemos aqui é a manutenção da hipótese que vem sendo constantemente abordada: o papel do ambiente na perpetuação da multirresistência (LIU et al., 2016; NORDMANN; POIREL, 2016).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produção de frangos no Brasil

A avicultura brasileira possui um papel de destaque no mundo. O Brasil detém 40% do mercado mundial de carne de frango, produzindo 13,146 milhões de toneladas/ano, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (ABPA, 2015). É também o maior exportador do mundo de carne de frango, tendo exportado em 2015, 4,304 milhões de toneladas, segundo a ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal) e USDA (*United States Department of Agriculture*), o que representa 8,5 bilhões de dólares em exportações para o país. A avicultura é responsável por 1,5% do PIB (Produto Interno Bruto) brasileiro, gerando 5 milhões de empregos diretos e indiretos. A carne de frango representa 47% das carnes produzidas no território. Sendo os três estados da Região Sul do país os responsáveis por 76,66% das exportações, de acordo com a ABPA, 2015.

Após inúmeras décadas de esforço, frente às demais potências econômicas mundiais o Brasil ganhou destaque no setor. O que só foi possível com o advento da agricultura industrial e a união de esforços entre produtores rurais e agroindústrias tendo como objetivo a ampliação de mercados com uma visão empresarial empreendedora.

A prática dos sistemas intensivos de produção, tendo como objetivo a alta produção animal com baixo custo e alta qualidade foi conquistada, e programas como o de sanidade animal e de biossegurança eficientes que garantem a sanidade dos plantéis e os acordos sanitários, mantém o Brasil nesta posição de destaque.

2.2 Uso de antimicrobianos na avicultura

A indústria avícola só conseguiu aumentar a sua produtividade com o incremento da tecnologia. A tecnificação acompanhada pelo sistema de integração vertical das grandes empresas e suas instituições, age coordenando e fiscalizando grande parte dos processos produtivos.

Mesmo assim, os desafios sanitários impostos pelas condições das criações como a alta densidade de animais alojados, grandes variações de temperatura e necessidades nutricionais, podem diminuir o desempenho zootécnico das aves por desencadearem problemas em sua microbiota intestinal.

Os lotes de aves são criados na maioria das vezes em camas reutilizadas,

com elevada carga microbiana, deixando os animais expostos a enfermidades como a coccidiose e a clostridiose.

A fim de manter os níveis atuais de desempenho produtivo e controlar a colonização do intestino por patógenos entéricos prejudiciais, principalmente na fase inicial da criação, a indústria lança mão do uso de aditivos à ração animal e um dos maiores colaboradores são os antimicrobianos. Seu uso é promovido devido à obtenção de efeitos benéficos, no que tange a absorção de nutrientes e a prevenção da multiplicação bacteriana patogênica no trato gastrointestinal (DURSO; COOK, 2014).

A utilização dos produtos antibacterianos é feita através da administração de subdoses junto à ração por quase toda a vida do animal, respeitando, apenas o período de carência (prazo para retirada antes do abate).

A possibilidade dos microrganismos patogênicos adquirirem resistência ao antibiótico, devido à ação contínua de doses subterapêuticas nas dietas é sabido um dos maiores problemas de sua utilização (KANG. et al., 2004; KUMARASAMY et al., 2010; PATEL; BONOMO, 2013; PATERSON; BONOMO, 2005; WALSH et al., 2011; YONG et al., 2009).

Porém, lembremo-nos da existência de uma lista positiva de aditivos permitidos para utilização na produção animal como melhoradores de desempenho. No documento disponibilizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) constam, além dos princípios ativos, as espécies e as fases de produção em que podem ser utilizados e as dosagens permitidas (BRASIL, 2006).

Na contramão do mundo, um exemplo a ser seguido, é o da comunidade europeia que banuiu o uso dos antibióticos como aditivos alimentares desde 2006 (Regulamento CE nº 1831/2003) embora a sua utilização com finalidade terapêutica permaneça autorizada. Com isso, reduziu drasticamente a quantidade de antimicrobianos usados nos animais porém, um aumento na utilização terapêutica foi constatada (BUROW et al., 2014).

A preocupação dos europeus com a transferência da resistência à população humana alavanca alternativas a essa utilização e estratégias estão sendo traçadas pela União Europeia até 2020 (ECDC/EFSA/EMA, 2015). Pela primeira vez, um documento integrando relações entre o consumo de agentes antimicrobianos e a ocorrência de resistência em humanos e animais de produção foi elaborado, integrando dados relativos a três das agências da Comunidade Europeia

(ECDC/EFSA/EMA, 2015).

As análises mostraram que, em 15 dos 26 países participantes do estudo, o consumo médio de antimicrobianos foi inferior ou muito menor em animais produtores de alimentos do que em seres humanos. Em três países, o consumo foi semelhante nos dois grupos, e em oito países o consumo em animais produtores de alimentos foi maior ou muito mais elevado do que em seres humanos (ECDC/EFSA/EMA, 2015).

Na maioria dos países, o consumo de fluoroquinolonas foi maior na medicina humana em detrimento do setor animal. E em todos os países analisados, o consumo de cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações foi muito maior em humanos do que nos animais produtores de alimentos (ECDC/EFSA/EMA, 2015).

O Brasil deve repensar o seu uso e discutir alternativas à utilização de fármacos, mesmo que estudos ainda careçam de elucidação (DALÓLIO et al., 2015; TRALDI et al., 2007).

2.2.1 Antimicrobianos administrados aos animais

Diferentes antimicrobianos podem ser administrados às aves durante seu período de vida como promotores de crescimento. Entretanto, para a sua utilização no Brasil, eles devem ser informados nos boletins sanitários dos lotes dos animais e devem constar na lista de aditivos alimentares autorizados pelo MAPA, conforme lista atualizada de 25/04/2015 (BRASIL, 2006).

Em aves, esses agentes são utilizados com o objetivo de diminuir a infecção causada por bactérias gram-positivas e prevenir a possibilidade de ocorrência de coccidiose causada pelos parasitas do gênero *Eimeria*.

Alguns aditivos, bastante utilizados nas práticas de produção avícolas, serão aqui elencados, bem como seus mecanismos de ação.

A Avilamicina (Surmax®) é autorizada para utilização em aves como melhorador de desempenho. Conforme indicações do fabricante, tem sua ação efetiva somente contra bactérias gram-positivas, cujo principal objetivo da administração é prevenir a enterite necrótica causada pelo *Clostridium perfringens*. É um oligossacarídeo da classe das ortosomicinas que tem como mecanismo de ação a inibição da síntese proteica bacteriana. Ela se liga à subunidade ribossômica 50S e impede a associação do fator de iniciação IF2, que inibe a formação do complexo de iniciação 70S e o posicionamento correto de tRNA no local aminoacilo. Este

mecanismo de ação é bem semelhante aos da classe dos antimicrobianos macrolídeos, cloranfenicol, clindamicina, quinupristin-dalfopristin, linezolida, que inibem a síntese proteica se ligando a subunidade 50S do ribossomo (BEBELL; MUIRU, 2014).

A *E. coli* é intrinsecamente resistente à avilamicina, entretanto, estudos *in vitro* têm sugerido que ela pode reduzir a produção de *pili* na superfície de *E. coli*. A exposição da *E. coli* à avilamicina pode então limitar o número de adesinas e reduzir a fixação das bactérias na mucosa intestinal prevenindo doenças no trato gastrointestinal por este agente ou alterando a composição da microbiota.

A salinomicina e a narasina são antibióticos coccidiostáticos ionóforos, que atuam sobre os diferentes estágios evolutivos do parasita do gênero *Eimeria*. São compostos poliéteres que formam compostos lipossolúveis que podem agir formando canais ou poros. Possuem afinidade pelos íons monovalentes (Na^+ e K^+) e, desta maneira tornam-se ionóforos transportadores que se movem através da membrana celular carregando íons e alterando o equilíbrio hidroeletrolítico celular. O transporte de íons através da membrana compromete a produção de ATP exaurindo a fonte de energia do organismo. Outra maneira é ocorrer influxo de grande quantidade de moléculas de água carregadas pelos mecanismos osmóticos, promovendo turgidez e morte celular (SPINOSA; GORNIK; BERNARDI, 2011).

A translocação de íons e o rompimento de gradientes iônicos são responsáveis pelos efeitos terapêuticos e tóxicos dos ionóforos (PRESSMAN, 1965;1968). No primeiro momento, a ação deles sobre a membrana celular das bactérias ruminais, coccídios ou fungos patogênicos, resulta em efeitos benéficos para o hospedeiro (PRESSMAN, 1976; RUSSELL; STROBEL, 1989).

Nicarbazina é um anticoccidiano preventivo sintético, cujo mecanismo de ação é atuar na fase esquizonte da *Eimeria* sp. (2ª geração), interrompendo o ciclo de formação e desenvolvimento dos merozoítos, interferindo no metabolismo das mitocôndrias do parasita (SPINOSA; GORNIK; BERNARDI, 2011).

A bacitracina é um antimicrobiano polipeptídico, que age sobre a maioria das bactérias gram-positivas. Seu mecanismo de ação acontece através da inibição da síntese de parede celular, inibindo a desfosforilação de um pirofosfato lipídico (carreador de natureza lipídica presente na membrana celular da bactéria). Parece provocar lesão à membrana citoplasmática (SPINOSA; GORNIK; BERNARDI, 2011).

2.3 Família Enterobacteriaceae

As enterobactérias constituem um importante grupo bacteriano, bastante heterogêneo. São organismos não formadores de esporos, ubiqüitários, estão amplamente distribuídos no solo, água, frutas, vegetais, grãos, flores, árvores, animais, estando presentes também em insetos e no homem. A maioria habita o intestino dos animais, quer fazendo parte da microbiota normal ou como agente infeccioso. São eliminados pelas fezes contaminando o solo e água (QUINN et al., 2005).

São bastonetes gram-negativos bioquimicamente caracterizados por serem anaeróbios facultativos, catalase positivos, oxidase negativos, fermentadores de glicose e outros açúcares, na maioria das vezes com produção de gás, podendo ser cultivados numa variedade de meios nutritivos por não possuírem exigências nutricionais complexas (FARMER et al., 2007). Possuem fimbrias que os ajudam na aderência de superfícies ou mucosas. Possuem também uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos, que são potentes endotoxinas, estando o principal fator endotóxico presente no lipídio A. Estas endotoxinas são liberadas quando a bactéria morre ou sofre lise (QUINN et al., 2005; TORTORA; FUNKE; CASE., 2012).

Podem apresentar *pili* sexual responsável pela troca de informações genéticas entre as células, o que lhes permite a troca de genes que conferem resistência a antibióticos e outros fatores de virulência. Algumas cepas produzem proteínas chamadas bacteriocinas que causam a lise de outras espécies bacterianas intimamente relacionadas. Estas proteínas podem ajudar a manter o equilíbrio ecológico do intestino (TORTORA; FUNKE; CASE., 2012).

As enterobactérias podem causar infecções intestinais e extraintestinais. As que causam infecções intestinais são geralmente chamadas de enteropatogênicas, incluindo cepas de *Escherichia coli*, todos os sorotipos de *Shigella*, quase todos os de *Samonella* e alguns de *Yersinia* (TRABULSI; CAMPOS, 2002).

As bactérias desta família são importantes agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (MINARINI et al., 2007; MINARINI et al., 2008; MINARINI et al., 2009). Isso torna o ambiente uma fonte para a disseminação e aquisição destas bactérias resistentes (ALLEN et al., 2011).

2.3.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é a bactéria anaeróbica facultativa mais abundante da microbiota do intestino delgado humano (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Membro da família Enterobacteriaceae, é um bacilo gram-negativo mesófilo típico. De modo geral a *E. coli* se apresenta como um bastonete delgado, pequeno ou comprido (1,1-1,5 μm x 2,6-6,0 μm), aos pares ou isolados. Ao teste de Voges-Proskauer é negativa, não é capaz de utilizar o carbono do citrato como única fonte de energia, não produz H_2S e a hidrólise da uréia é negativa (QUINN et al., 2005). No Indol, a reação é positiva devido à redução de nitrato a nitrito (BETTELHEIM, 1994).

Seu pH ótimo de crescimento é 7,5, apesar de tolerar grandes variações. Não apresenta termorresistência, sendo destruída a 60°C em poucos segundos (GERMANO; GERMANO, 2011). Algumas cepas são móveis e outras imóveis, não esporulam, integram o grupo dos microrganismos coliformes, cuja presença na água e alimentos indica contaminação fecal (JAY, 2005).

Está presente em maior número em carnívoros e onívoros em detrimento dos herbívoros. Nas aves se encontram na concentração de 10^6 UFC/grama (unidades formadoras de colônias) de fezes, podendo estar em maior concentração no intestino das aves jovens (BARNES, 2003). Ela é excretada através das fezes e sobrevive nas partículas fecais, poeira e água por semanas ou meses (QUINN et al., 2005).

Na Figura 2 a *E. coli* está relacionada dentro do contexto “One Health”.

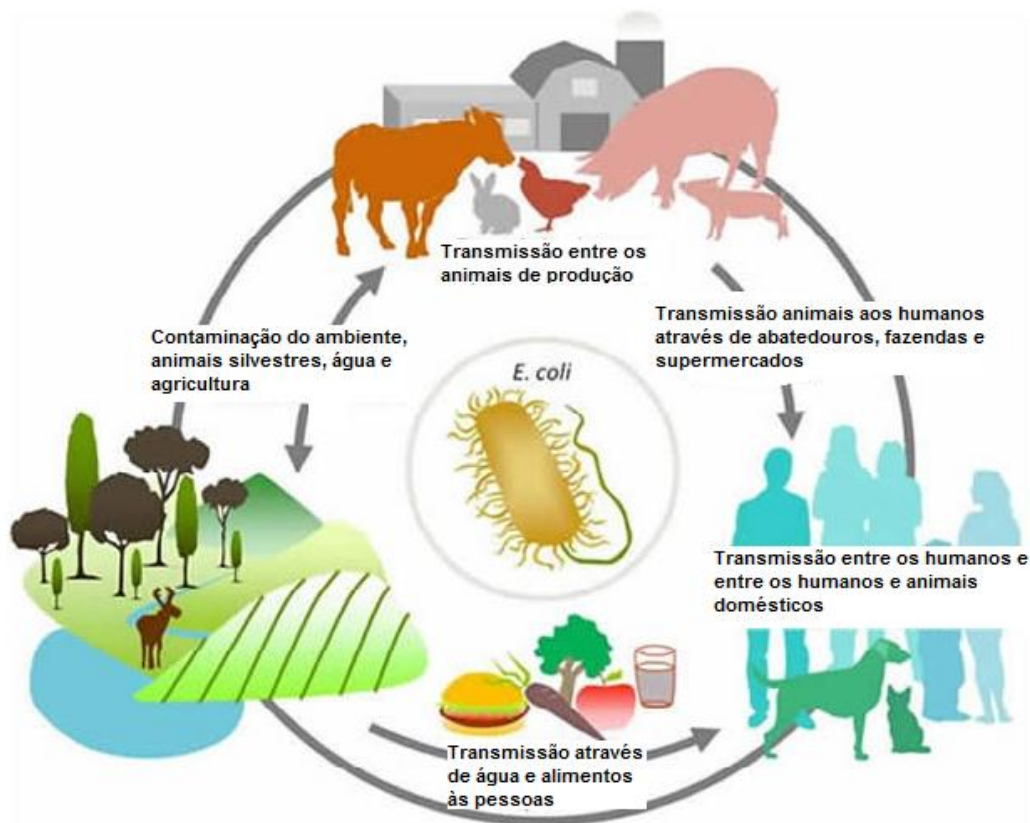


Figura 2. Disseminação de *E. coli* entre os diferentes habitats^a.

^aAdaptado de: <http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/index.asp>

Existem cepas de *E. coli* que se diferem das habitantes naturais do trato gastrointestinal. São altamente patogênicas, o que foi proporcionado através do ganho e perda de genes que permitem que ela se torne altamente diversificada e adaptada (CROXEN et al., 2013). As cepas patogênicas estão entre os principais contribuintes de mortes causadas por doenças diarreicas em crianças de até cinco anos no mundo (WHO, 2012).

Segundo o esquema de classificação modificado de Kauffman, esta espécie compreende um grande número de tipos sorológicos identificados por meio dos seus antígenos de superfície: somáticos “O”, flagelares “H” e capsulares “K” (CROXEN et al., 2013).

De acordo com os mecanismos de patogenicidade, fatores de virulência, modos de adesão em culturas de células epiteliais e os sintomas clínicos que causam, as cepas de *E. coli* podem ser classificadas em patógenos intestinais, extra-intestinais ou uropatogênicas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; TRALDI et al., 2007).

2.4 Resistência antimicrobiana no contexto atual

Antimicrobianos são compostos que agem inibindo o crescimento dos microrganismos e/ou causando sua morte diretamente (SPINOSA; GORNIK; BERNARDI, 2011). São administrados visando o tratamento ou a prevenção de doenças em humanos e animais e são amplamente utilizados como aditivos à alimentação animal, promovendo o melhoramento do desempenho zootécnico dos animais de produção (AARESTRUP, 1999; SCHWARZ; KEHRENBURG; WALSH, 2001).

O uso dessas substâncias como promotoras de crescimento é de relevante preocupação na saúde pública, considerando-se os riscos destes resíduos nos produtos derivados de animais e a seleção de bactérias resistentes (OJO et al., 2016; SINGER et al., 2003).

A resistência antimicrobiana pode ser interpretada como a habilidade de um microrganismo continuar multiplicando-se ou persistir na presença de níveis terapêuticos de determinado agente antimicrobiano (VERRAES et al., 2013).

No que tange à *E. coli* comensal de animais, já é conhecida sua resistência frente à maioria dos agentes antimicrobianos comumente utilizados, como as tetraciclina, sulfametoxazol, ampicilina, estreptomicina e carbenicilina (KANG et al., 2005).

2.5 Reservatórios ambientais de genes de resistência

As comunidades bacterianas são formadas por uma complexa matriz evolutiva, associada a fatores ecológicos e ambientais. É difícil prever o destino das bactérias resistentes e dos genes de resistência quando são liberados no ambiente. A compreensão da evolução e ecologia da resistência aos antibióticos, neste cenário, carece de elucidação. Embora saibamos que a utilização excessiva de antibióticos pode selecionar populações resistentes no ambiente, outros fatores como condições físico-químicas, contaminantes ambientais, indução de respostas ao estresse, a adaptação bacteriana e a heterogeneidade fenotípica têm o potencial para aumentar o efeito de pressões seletivas e promover a evolução bacteriana no sentido de selecionar cepas mais resistentes aos antibióticos (BERENDONK et al., 2015).

A presença de genes de resistência aos antibióticos é ubíqua e antiga. A maioria dos genes que codifica a resistência entre os patógenos humanos teve a sua origem em bactérias do ambiente natural (por exemplo, β -lactamases). Um importante

exemplo de mecanismos de resistência que impactaram na saúde humana foi a resistência apresentada aos antimicrobianos β -lactâmicos, cujas enzimas (β -lactamases) que inativam estes antimicrobianos existem há milhões de anos (AMINOV, 2009).

Estudos realizados através da análise de filogenia foram capazes de reconstruir a evolução dos grupos de β -lactamases (serino e metalo), e estabeleceram que estas enzimas são antigas e se originaram há mais de dois bilhões de anos, com algumas delas presentes em plasmídeos bem antes do uso moderno de antibióticos (HALL; BARLOW, 2004).

Com o uso da metagenômica funcional de microrganismos do solo, foi possível mostrar uma diversidade ampla de determinantes genéticos que conferem resistência aos antibióticos, dos quais apenas uma fração foi descrita em patógenos humanos (FORSBERG et al., 2014).

A atividade humana moderna exerce forte e determinante influência sobre o resistoma ambiental. Isso destaca a importância de incluir o papel dos vetores ambientais, tais como a diversidade genética bacteriana dentro do solo e da água, na gestão do risco de resistência. A subsequente transmissão é afetada por padrões de controle de infecção, saneamento, acesso à água potável, acesso a antimicrobianos de qualidade, viagens e migração (FINLEY et al., 2013).

É importante notar que embora animais produtores de alimentos contribuam para a ampla disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos e genes de importância clínica (MARSHALL; LEVY, 2011), eles não são necessariamente a causa do problema (HUNTER et al., 2010; SINGER et al., 2003).

Nas práticas agrícolas de produção da China, o esterco dos animais é utilizado como fertilizante na produção de culturas, frutas e produtos hortícolas (HUANG et al., 2014). Porém, não é dado qualquer tratamento a estes excrementos que podem conter grande quantidade de bactérias patogênicas, como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., além de bactérias carreadoras de genes de resistência como *E. coli* produtora de ESBL, *Enterococcus* resistentes à vancomicina e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (GAO et al., 2015; GUBER et al., 2007; MARTI et al., 2013; VENGLOVSKY; SASAKOVA; PLACHA, 2009; ZHU et al., 2013).

Quando o esterco animal é adicionado ao solo, os genes de resistência ali contidos podem ser transferidos a outras bactérias por meio de elementos genéticos,

principalmente plasmídeos (D'COSTA et al., 2006; GUBER et al., 2007; HEUER; SCHMITT; SMALLA, 2011).

Relatos sobre a contaminação de vegetais com microrganismos carreadores de genes de resistência também são encontrados (REULAND et al., 2014; RUIFY et al., 2010).

Bacteriófagos presentes nas fezes dos animais carreando genes de resistência também preocupam, não só por possibilitar a transferência dos genes para cepas patogênicas humanas mas também para animais (ALLEN et al., 2011). Isso contribui para a disseminação de bactérias no solo e a sua propagação aos outros ambientes incluindo a cadeia alimentar. Solo poluído pode contaminar as águas sobre o fluxo de terra (CURRIERO et al., 2001; GAO, L. et al., 2015), tornando-se uma forte ameaça à saúde pública.

Estudos realizados em Bangladesh em 2012 comprovaram a ampla disseminação ambiental de NDM-1 e CTX-M-15. Esses genes foram detectados em 36 (62%) e 41 (71%), respectivamente das 58 amostras de água coletadas (TOLEMAN; BUGERT; NIZAM, 2015). A *E. coli* foi a espécie carreadora de NDM-1 em 3 das 7 regiões amostradas no estudo, fato de grande importância epidemiológica, já que esta espécie é encontrada no nosso intestino mas pode também causar infecções graves (PITOUT, 2012).

2.6 Bases genéticas de resistência aos antibióticos

A resistência antimicrobiana pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é característica inerente de uma espécie bacteriana ou gênero para um determinado antibiótico (GUARDABASSI; COURVALIN, 2006). A resistência adquirida é quando uma cepa suscetível tornou-se resistente, como consequência de uma evolução recente. Pode ser resultado de uma mutação, que é geralmente um evento espontâneo a acontecer dentro de uma população bacteriana, ou através da aquisição de um gene de resistência específico por transferência horizontal de genes (VERRAES et al., 2013).

A mutação pode levar à alteração do sítio de ligação de determinado agente, hiper-regular a produção de enzimas inativando o princípio ativo e também, alterar a proteína de transporte da membrana externa (ALEKSHUN; LEVY, 2007; MONROE; POLK, 2000).

A transferência horizontal de genes pode acontecer através de 3

mecanismos: transdução, conjugação e transformação. Estas transferências podem ocorrer no solo, na água, nos sistemas digestivos de humanos e animais, em alimentos, mucosas e outros ambientes (VERRAES et al., 2013).

Na maioria das vezes, os genes de resistência localizam-se em elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e cassetes gênicos em integrons. A replicação dos plasmídeos acontece independentemente dos cromossomos e estes elementos podem ser transferidos entre as bactérias por conjugação. Sua presença dentro da bactéria não é essencial, mas pode conferir uma vantagem adaptativa e desempenhar desta forma um importante papel (VERRAES et al., 2013).

2.7 Mecanismos de resistência em bactérias Gram-negativas

Bacilos gram-negativos podem ser resistentes a antibióticos através de quatro principais mecanismos: alteração na permeabilidade de membrana; degradação enzimática dos antibióticos, mutações na proteína-alvo do antimicrobiano e mecanismos de efluxo (BARTH et al., 2013).

A resistência através da modificação do sítio alvo do antibiótico, faz com que o antibiótico perca sua capacidade de ligação à bactéria. Mutações nos genes da girase e topoisomerase que são os alvos para quinolonas e fluoroquinolonas são exemplos deste mecanismo (RAPOPORT et al., 2016).

A alteração da parede celular ou em sua permeabilidade implica na redução de entrada ou no aumento do efluxo de antibióticos, regulando desse modo a concentração interna de antibióticos na célula (MCDUGAL et al., 2003). Além disso, as bactérias podem se tornar resistentes, desviando-se da via fisiológica normal, adicionando um passo alternativo. Isto é exemplificado pela produção de uma adicional di-hidrofolato-redutase, em um plasmídeo-R determinante de resistência a trimetoprim, a qual difere da enzima cromossômica na sua ligação com vários compostos anti-folato em *Escherichia coli* e *Citrobacter* sp. (LYTSY et al., 2008).

2.7.1 Resistência aos β -lactâmicos

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos, pode ocorrer através dos sistemas de efluxo e perda de porinas que irão influenciar na permeabilidade das membranas, através da alteração da estrutura do peptidoglicano; devido a mutações nas proteínas ligantes de penicilina (PBPs), levando à diminuição da afinidade da

ligação do antibiótico ao local de ação; e através dos mecanismos enzimáticos de degradação do antibiótico.

São mecanismos comuns e importantes em bactérias gram-negativas, a degradação do antibiótico mediada por enzimas β -lactamases, que são amidases hidrolíticas que quebram o anel β -lactâmico inativando o antibiótico (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008).

As β -lactamases podem ser classificadas de duas formas: pela classificação de Ambler, que se baseia na homologia proteica; ou a classificação de Bush-Jacoby que está baseada nas características funcionais. De acordo com Ambler, as enzimas são divididas em quatro grandes classes (A à D). As classes A, C e D utilizam serina no sítio de ligação para a realização da hidrólise do β -lactâmico e a classe B são as metalo- β -lactamases, que necessitam do íon divalente zinco para realizar a hidrólise do substrato (AMBLER, 1980; AMBLER et al., 1991; BUSH; JACOBY, 2010; JAURIN; GRUNDSTROM, 1981; OUELLETTE; BISSONNETTE; ROY, 1987).

A classificação de Bush-Jacoby divide as β -lactamases em quatro grupos principais: penicilinases, β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs), carbapenemases e AmpC *type* cefalosporinases, além de seus vários subgrupos (BUSH; JACOBY, 2010; ZHOU et al., 2007). Alguns exemplos de β -lactamases de importância clínica encontram-se dispostos na Tabela 1, com destaque para as ESBLs.

Estas enzimas estão incluídas nas classes A de Ambler e grupo 2be na classificação de Bush-Jacoby. Conferem resistência a todas as penicilinas e cefalosporinas, incluindo as cefalosporinas de espectro estendido como ceftazidima ou cefotaxima e são inibidas pelo ácido clavulânico (BUSH; JACOBY, 2010).

Como exemplos de ESBLs temos diversas famílias como TEM-, SHV-, CTX-M- PER-, VEB- (BUSH; JACOBY, 2010).

Tabela 1. Principais β -lactamases de importância clínica.

Grupo Bush, Jacoby	Classe Molecular de Ambler	Substrato Preferido	Inibição		Exemplo de enzimas representativas
			AC ^a	EDTA	
1, 1e	C	Cefalosporinas	-	-	CMY-1 à CMY-50
2b	A	Penicilinas e cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, TEM-13
2be ^b	A	Cefalosporinas de espectro estendido(ESBL), monobactâmicos	+	-	TEM-3, SHV-2, SHV-15, CTX-M-1, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	-	-	TEM-30, TEM-163, SHV-10, SHV-72
2ber	A	Cefalosporinas de espectro estendido, monobactâmicos	-	-	TEM-50, TEM-158
2d	D	Cloxacilina	Variável	-	OXA-1, OXA-2, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro estendido	Variável	-	OXA-11, OXA-14, OXA-15
2df	D	Carbapenêmicos	Variável	-	OXA-23, OXA-51, OXA-48
2f	A	Carbapenêmicos	Variável	-	GES-2, KPC-2, SME-1
3a	B	Carbapenêmicos	-	+	IMP-1, VIM-1, IND-1, NDM

^aAC. Ácido Clavulânico ^bGrupo funcional das principais ESBLs de importância clínica.

Adaptado de BUSH; JACOBY, 2010.

Infecção e colonização humana por membros da família Enterobacteriaceae produtores de ESBLs tem se tornado cada vez mais comum no mundo todo (ECDC/EFSA/EMA, 2015; NAKAYAMA et al., 2015). Mais de 180 ESBLs já foram identificadas em *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e outras Enterobacteriaceae (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008; FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001; HAWKEY, 1998; RICE; BONOMO, 2005; WRIGHT, 2005).

O primeiro relato de β -lactamase codificada por plasmídeo, capaz de hidrolisar as cefalosporinas de espectro estendido, foi publicado em 1983 (KNOTHE et al., 1983). As ESBLs são frequentemente carregadas por plasmídeos e desta maneira a presença delas tem um enorme significado clínico. Plasmídeos responsáveis pela disseminação de ESBLs frequentemente carregam genes que codificam resistência a outras classes de drogas (por exemplo, aminoglicosídeos)

(LIEBANA et al., 2013). Assim, os carbapenêmicos são o tratamento de escolha para infecções graves causadas por organismos produtores de ESBL (KANG et al., 2004; PATERSON; BONOMO, 2005).

Hoje em dia, as famílias de ESBLs mais predominantemente encontradas são *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} (POIREL; BONNIN; NORDMANN, 2012). Até novembro de 2016, 222 TEM, 194 sequências de SHV e 172 variantes de CTX-M foram publicadas no banco de dados Lahey (<http://www.lahey.org/Studies/>).

As enzimas CTX-M são divididas em 6 principais grandes grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 e CTX-M-45 (D'ANDREA et al., 2013; ROSSOLINI; D'ANDREA; MUGNAIOLI, 2008).

As ESBLs têm se revelado, de longe, as mais bem sucedidas na disseminação no ambiente clínico. E não só isso, estão disseminadas na comunidade, entre os animais de companhia, e de produção como bovinos (D'ANDREA et al., 2013; EWERS et al., 2012), animais silvestres (GUENTER; EWERS; WIELER, 2011) e efluentes (CHEN et al., 2010; CHOUCANI et al., 2013; DHANJI et al., 2011; TACAO; CORREIA; HENRIQUES, 2012).

2.7.1.1 Carbapenemases

Carbapenemases são enzimas presentes em bactérias gram-negativas que hidrolisam os carbapenêmicos e em geral, todos os antibióticos β -lactâmicos (cefalosporinas e penicilinas) (NORDMANN; POIREL, 2002; QUEENAN; BUSH, 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as consequências para o tratamento das infecções causadas por estas bactérias são relevantes, dado que praticamente não existe arsenal terapêutico eficaz para as infecções causadas pelos patógenos produtores de carbapenemases (GUERRA; FISCHER; HELMUTH, 2014).

De acordo com suas propriedades moleculares, as carbapenemases podem ser reunidas em enzimas de classes A (serino-carbapenemases), B (metalo-enzimas) e D (oxacilinases), segundo a classificação de Ambler. Às pertencentes às classes A e D são serino-carbapenemases, e as pertencentes à classe B são metalo β -lactamases (NORDMANN; POIREL, 2002; QUEENAN; BUSH, 2007).

As metalo- β -lactamases, compreendem os tipos IMP, VIM e NDM (classe

B) que são as mais frequentemente detectadas em enterobactérias; dentre as serino-carbapenemases temos as OXA-carbapenemases (classe D), sendo a OXA-48 a mais frequente em enterobactérias; e as do tipo KPC, tendo como representantes GES e KPC (classe A) (BUSH; JACOBY, 2010)

Epidemiologicamente, as carbapenemases do tipo KPC e as do tipo NDM são as mais importantes em enterobactérias, pois ambas apresentaram rápida e ampla disseminação mundial após suas descrições iniciais (BRASIL, 2013).

Dentro da família Enterobacteriaceae, as carbapenemases de classe A (enzimas KPC) surgiram na Carolina do Norte (EUA) em 1996 e mais tarde se espalharam para a Europa e outros continentes; as da classe B surgiram como VIM-1 em *E. coli* na Grécia, mas rapidamente se disseminaram para *K. pneumoniae*, tornando-se endêmica no país, bem como em outros países europeus; e a OXA-48 surgiu na Turquia em *K. pneumoniae*, e mais tarde em outros países do Mediterrâneo (GRUNDMANN et al., 2010; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; NORDMANN; POIREL; et al., 2011).

Desde sua citação inicial no Brasil, várias publicações têm demonstrado a disseminação de KPC em todo o território, e sua presença em diversos gêneros e espécies bacterianas, inclusive em gram-negativas não fermentadoras (MONTEIRO et al., 2009; PEREIRA et al., 2013). Sua disseminação é um grave problema clínico e epidemiológico em diversas instituições de saúde brasileiras. KPC é a mais prevalente carbapenemase distribuída no mundo.

NDM é a carbapenemase mais comum dentre as enzimas da classe B em Enterobacteriaceae. O primeiro caso documentado foi em 2008 na Índia, embora análises retrospectivas tenham comprovado o isolamento em Enterobacteriaceae em amostras guardadas de 2006 (JOHNSON; WOODFORD, 2013). NDM-1 se espalhou rapidamente para vários países em todo o mundo e parece ser endêmica no Sul da Ásia (KUMARASAMY et al., 2010; PATEL; BONOMO, 2013; YONG et al., 2009). Um estudo ambiental realizado na Índia, mostrou que a enzima está presente em 30% das águas superficiais e de esgoto, sendo que também foi detectada na água destinada ao consumo humano (WALSH et al., 2011).

Em 2013 foi reportado o primeiro caso de NDM-1 do Brasil, na cidade de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul em isolado de *Providencia rettgeri* em ambiente

hospitalar (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). Desde a descrição inicial, a NDM já foi reportada em outros microrganismos no mesmo Estado Brasileiro (ROZALES et al., 2014), no Rio de Janeiro (PEREIRA et al., 2014) e em Londrina no Paraná (PILLONETTO et al., 2014).

A presença de genes codificadores de carbapenemases em Bacilos Gram-negativos (BGN) de bovinos, animais de companhia e animais silvestres já é uma realidade. Em alimentos, a ocorrência destes isolados ainda não foi relatada, mas em analogia com outros mecanismos de resistência, podemos supor que é apenas uma questão de tempo (GUERRA; FISCHER; HELMUTH, 2014).

Apesar da importância clínica e epidemiológica que possuem, a prevalência destes genes em bactérias zoonóticas comensais ou de animais é desconhecida. A partir disso, torna-se necessária uma intensificação da vigilância sobre a ocorrência de bactérias carreadoras de β -lactamases na cadeia alimentar e de outras fontes de origem animal, a fim de conhecer melhor o reservatório ambiental destes genes e contribuir para a formulação de medidas que busquem reduzir a sua propagação potencial (DE JONG et al., 2014).

2.7.2 Resistência às polimixinas

A resistência às polimixinas até novembro de 2015 era caracterizada por mutações cromossômicas e não representava risco quanto à disseminação rápida dessa resistência. Entretanto, a recente e crescente identificação de um mecanismo de resistência à polimixina mediada por plasmídeo através do gene *mcr-1* entre isolados da família Enterobacteriaceae de humanos e animais tem causado preocupação (LIU et al., 2016).

MCR-1 é uma fosfoetanolamina transferase, que modifica o lipopolissacarídeo adicionando fosfoetanolamina ao lípido A, o que reduz a carga aniônica do LPS e, subsequentemente, a sua afinidade às polimixinas (LIU et al., 2016).

Transcorridos seis meses da primeira descrição, verificou-se que o gene *mcr-1* já foi identificado na maioria dos continentes (Figura 3). Foi isolado de animais produtores de alimentos, do ambiente, incluindo águas de rio, de alimentos como carnes e legumes, de pacientes infectados e humanos portadores assintomáticos, incluindo viajantes internacionais, de animais de companhia, de aves silvestres, além

de ter sido encontrado em várias espécies bacterianas, e em vários plasmídeos diferentes. *E. coli* é o principal hospedeiro de MCR-1 sendo uma das espécies bacterianas mais amplamente distribuída entre ambiente, animais e seres humanos (SKOV; MONNET, 2016).

A grande preocupação é a existência do gene *mcr-1* entre plasmídeos conjugativos carreadores de outros genes de resistência como de ESBL e de carbapenemases (ANJUM et al., 2016; CANNATELLI et al., 2016; DOUMITH et al., 2016; FALGENHAUER et al., 2016; GAO et al., 2016; HAENNI et al., 2016b; LI et al., 2016; MALHOTRA-KUMAR et al., 2016; SUN et al., 2016; XAVIER et al., 2016a; YANG et al., 2016; YAO et al., 2016; YE et al., 2016; ZHI et al., 2016), apoiando a co-transferência e a persistência deste gene sob a seletiva pressão imposta através da utilização de antibióticos (SCHWARZ; JOHNSON, 2016). A possibilidade do mesmo plasmídeo carrear mais genes de resistência, além do *mcr-1* já foi chamado pela comunidade científica de “apocalipse dos antibióticos” (NORDMANN; POIREL, 2016).

A propagação determinante de MCR-1 pode seguir a mesma tendência observada para ESBLs do tipo CTX-M. Foi localizada primeiro em *E. coli*, em seguida, em espécies nosocomiais, em *K. pneumoniae* sendo fonte de múltiplos surtos (NORDMANN; POIREL, 2016).

As polimixinas (polimixina B e E) não são usualmente utilizadas na medicina humana. Contudo, devido ao aumento de isolados resistentes aos carbapenêmicos, elas acabam sendo o último recurso para o tratamento de infecções graves causadas por enterobactérias e *Acinetobacter spp.* para as quais outras opções de tratamento são limitadas. Já na medicina veterinária, as polimixinas são largamente utilizadas, principalmente para o controle de diarreia em suínos e em aves de produção (EMA, 2013).

Dados relativos a quantidade de colistina (polimixina E) utilizada no mundo são escassos. Porém na China, Liu e colaboradores informaram que 12.000 toneladas de colistina foram utilizadas em 2015 neste país e que o gasto com colistina para uso veterinário aumentou de USD 8,7 bilhões no ano de 1992 para uma projeção de USD 43 bilhões em 2018 (LIU et al., 2016).

O fato do gene que medeia a resistência à colistina estar sendo identificado principalmente nos animais, combinado com o seu uso muito maior neste grupo do

que em seres humanos, tem contribuído para a percepção de que o problema tem de ser resolvido primeiramente na medicina veterinária (NORDMANN; POIREL, 2016).

A detecção de microrganismos produtores de MCR-1 pode ser difícil porque *in vitro* os níveis de resistência à colistina nas amostras podem ser baixos (DU et al., 2016; FALGENHAUER et al., 2016; HAENNI et al., 2016b; LIU et al., 2016; NORDMANN et al., 2016; POIREL et al., 2016).

Entretanto, caso os índices de resistência não sejam detectados precocemente na prática clínica humana e medidas de controle adequadas não sejam implementadas, o mundo poderá enfrentar surtos hospitalares de infecções para as quais haverá pouco, ou nenhuma opção de tratamento antibiótico (NORDMANN; POIREL, 2016).

Cabe ressaltar que a recente descoberta do gene *mcr-2* que também confere resistência à colistina, ressalta a importância deste mecanismo e que medidas devem ser adotadas visando à mudança de práticas quanto a utilização de colistina na medicina animal (XAVIER et al., 2016b).

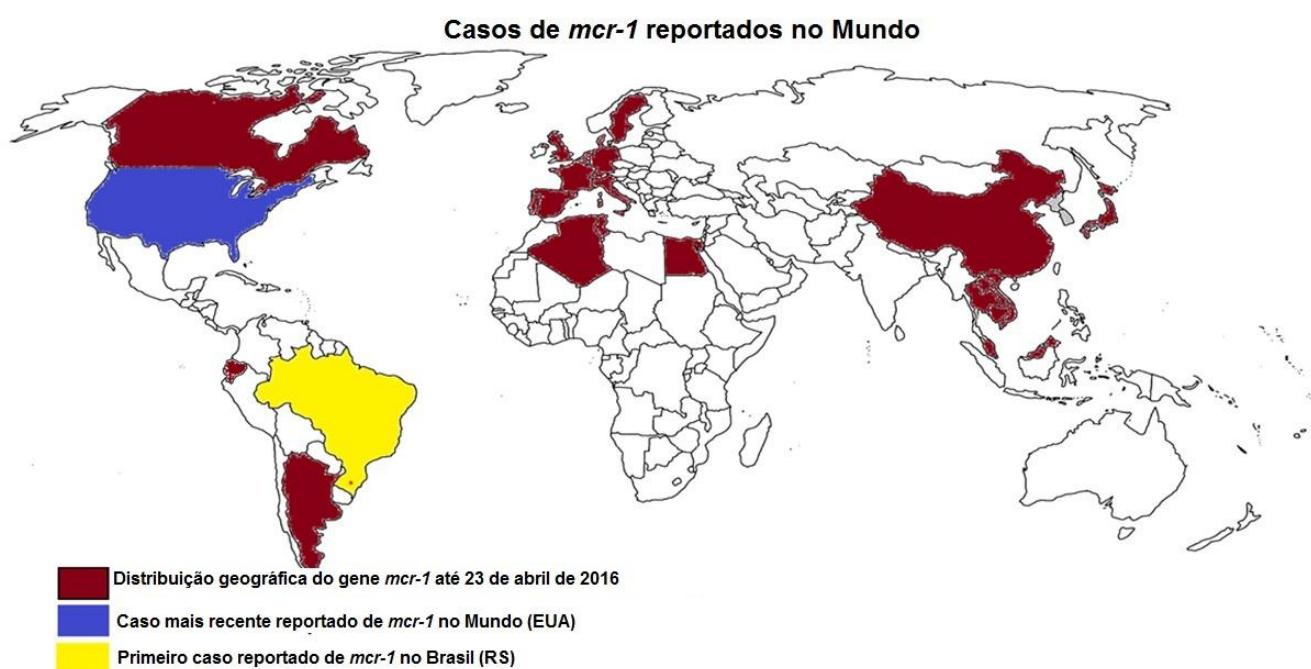


Figura 3. Distribuição geográfica do gene *mcr-1* no mundo^a.

^aAdaptado de LENTZ, et al., 2016.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a prevalência de genes de resistência em isolados de *E. coli* provenientes de frangos de corte.

3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a prevalência dos genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} nos isolados de *E. coli* em estudo;
- b) Avaliar a presença de carbapenemases *bla*_{IMP}-type, *bla*_{VIM}-type, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}-type, *bla*_{GES}-type, *bla*_{OXA-48} nos isolados;
- c) Pesquisar o gene *mcr-1* em isolados de *E. coli* provenientes de frangos de corte;
- d) Relacionar o consumo de antimicrobianos com a identificação dos genes de resistência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e transporte das amostras

A coleta das amostras foi realizada na plataforma de abate de um abatedouro frigorífico de aves localizado no Rio Grande do Sul, com Inspeção Federal do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Elas ocorreram em cinco dias diferentes entre os meses de agosto e outubro de 2015. Foram coletadas 340 aves distribuídas em 17 lotes (20 animais por lote), sendo que cada lote continha em média 14.000 animais. Foram seguidas as recomendações do Manual Veterinário de Colheita e Envio de Amostras da Organização Pan Americana de Saúde - OPAS (CASTRO et al., 2010).

A partir dos caminhões que aguardavam na área de espera, cada ave foi retirada da caixa de transporte, coletada e recolocada em uma nova caixa que era disponibilizada pelo abatedouro. Um dos membros da nossa equipe realizava a contenção da ave e outro a coletava.

Foi realizada de modo asséptico, através da introdução de suabe no orifício cloacal das aves, onde então foram realizados movimentos circulares para obtenção da amostra. Foi utilizado um suabe por ave e, após a coleta, eles foram colocados no

tubo contendo o meio de transporte Stuart (Absorve®).

Durante a coleta, a equipe utilizou uniforme descartável, toucas e luvas para manejar as aves, visando à manutenção da biossegurança no local e a proteção dos membros da equipe. Cuidados adicionais foram realizados para que o suabe não tocasse nada além da área amostrada (mãos dos coletadores, patas, outros tecidos, etc.), prevenindo a contaminação por microrganismos estranhos ao estudo.

Não foi causado qualquer dano ou sofrimento aos animais. As coletas foram realizadas de forma rápida e precisa, de maneira a não interferir no funcionamento da planta frigorífica. Conforme o guia da severidade, estes procedimentos estão abaixo do limiar inferior, com uma necessidade de contenção física mínima.

As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas até o laboratório. E seu processamento aconteceu no mesmo dia da coleta.

A definição do número de amostras foi realizada juntamente ao Laboratório de Epidemiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Levando em consideração uma sensibilidade de 100%, prevalência de 1% e o nível de confiança de 95% para uma população infinita.

4.2 Processamento das amostras

As amostras foram processadas no Laboratório de Microbiologia 166 do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os suabes foram embebidos em 10mL de Caldo Triptona Caseína de Soja (TSB- KASVI), contendo um disco de ceftazidima de 30µg e ampicilina de 10µg e foram incubados por 18 a 24 horas a 37 °C. O objetivo da adição da ceftazidima foi selecionar apenas as cepas resistentes a esta cefalosporina e a adição de ampicilina visou minimizar o crescimento de *Enterococcus* spp. conforme recomendação da ANVISA para culturas de vigilância (BRASIL, 2013).

Após o crescimento bacteriano no meio líquido, foi realizada semeadura em ágar MacConckey (HIMEDIA) transferindo material a partir do meio líquido e realizando semeadura por esgotamento. A partir deste esgotamento as placas foram incubadas por 18 a 24h a 37°C.

4.3 Identificação de *Escherichia coli*

A colônias que apresentaram morfologia característica de *E. coli*, foram identificadas usando meio seletivo sólido *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB - OXOID) e testes bioquímicos. Após identificação, os 343 isolados de *Escherichia coli* foram estocados em duplicata, em tubos criogênicos de 2mL contendo caldo nutriente *Brain Heart Infusion* (BHI - OXOID) com glicerol 16%, a -20°C no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) e a -80°C no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), para posterior caracterização do perfil de resistência antimicrobiana e testes moleculares.

4.4 Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Para avaliação do perfil de susceptibilidade foram utilizados fármacos representativos das seguintes classes de antimicrobianos: β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos), aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina, inibidores da via do folato e lipopeptídeos. Os métodos utilizados foram o teste de disco difusão em Ágar Mueller Hinton (OXOID), determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em caldo para a polimixina B e E (colistina) e também a determinação da CIM para Imipenem e Meropenem através de fita de gradiente de concentração (E-test[®]).

Para a realização do teste de disco difusão e CIM para Imipenem e Meropenem, foi preparada uma suspensão bacteriana 0,5 da escala de McFarland, através da utilização de densitômetro (DENSICHEK[™] PLUS) seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

A cepa padrão de *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada para controle de qualidade da execução e confiabilidade dos resultados.

Após 18h de incubação a 35°C, os resultados foram interpretados, e os isolados classificados como “sensíveis” (S), “intermediários” (I), ou “resistentes” (R) para os antimicrobianos avaliados, de acordo com o CLSI, 2015.

A escolha das drogas antimicrobianas utilizadas teve como base as principalmente empregadas sob o ponto de vista humano e veterinário e também foi baseada na orientação da Organização Mundial de Saúde (OMS) no que tange a utilização de determinados antimicrobianos no monitoramento da resistência bacteriana.

4.4.1 Avaliação do perfil de susceptibilidade à polimixina

O perfil de susceptibilidade à Polimixina B e colistina também foi realizado. No entanto, como não existe uma padronização para avaliar a susceptibilidade *in vitro* pelo método de disco difusão para este antibiótico, realizou-se através da determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo de acordo com a metodologia descrita pelo CLSI (2015). A CIM é a menor concentração de antimicrobiano capaz de impedir o crescimento bacteriano (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Preparou-se uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland, e posteriormente a suspensão foi diluída 1:100. As diluições do antimicrobiano variaram de 0,125 µg/mL até 128 µg/mL.

Para o controle da qualidade de execução e confiabilidade dos resultados obtidos, foi utilizada cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922.

A interpretação dos resultados foi realizada segundo o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

4.5 Extrações de DNA para pesquisa genotípica

O DNA foi extraído por lise térmica. Os isolados congelados foram então, primeiramente cultivados em Ágar Mueller Hinton a 37°C por um período compreendido entre 18 e 24h. Após o cultivo, foram selecionadas 2 a 3 colônias e realizada então uma suspensão bacteriana a 0,5 na escala de McFarland. Ela foi preparada em 500 µL de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,8) e então submetida a uma temperatura de 80°C em banho seco por 20 minutos e depois por mais 20 min em uma temperatura de -80°C. Após este procedimento que durou 40min a solução foi submetida a centrifugação por quatro minutos a 5.000 rpm. O precipitado foi então desprezado e o sobrenadante utilizado, o qual foi estocado a -80°C para posterior utilização.

4.6 Teste genotípico para pesquisa de *mcr-1*

Para detectar a presença do gene *mcr-1* foi realizada técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) *in house* usando os *primers* de Liu e colaboradores (LIU et al., 2016) sendo que as condições para realização do PCR foram adaptadas. O controle positivo foi um isolado de *E. coli* portador do gene *mcr-1* gentilmente cedido pela Faculdade de Ciências da Universidade de Fribourg (Suíça).

O volume total da reação foi de 25µL: 1,8µL MgCl₂ 50mM (Invitrogen®), 2,5 µL de cada dNTP a 2,5mM(Ludwig®), 0,4µL de *Taq* DNA polimerase a 5U/µL (SUPER-THERM POLYMERASE, JMRHoldings®), 2,5 µL de tampão de reação 10X (Invitrogen®), 0,7µL de cada oligonucleotideo iniciador a 10mM (1,4µL de primer F+R) (IDT®), 11,4 µL de água estéril, 5µL de extração de DNA.

A amplificação do DNA foi realizada com o Termociclador Veriti Thermal Cycler (Veriti®) de acordo com o programa que segue: ciclo de desnaturação inicial foi de 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, anelamento 59°C por 45 segundos, extensão de 72°C por 30 segundos e uma extensão final à temperatura de 72°C por 3 min.

Para observação dos produtos da PCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose e os produtos foram purificados e sequenciados.

4.6.1 *Conjugação bacteriana*

Para a realização do experimento de conjugação, os isolados de interesse e a cepa *E. coli* J53 (azida resistente) foram incubados separadamente visando a promoção do crescimento em caldo Luria Bertani (LB - DIFCO) a 37°C por 18 a 24h a 150 rpm. Após o crescimento bacteriano, 100µL das culturas bacterianas, separadamente, foram transferidas para 5mL de caldo LB, utilizando um tubo falcon de 50mL. As mesmas foram reincubadas à 37°C até que atingissem DO em 600nm de 0,5-0,7, o que ocorreu aproximadamente 3h após esta incubação. Utilizando um microtubo de 1,5mL, foram adicionados 900µL da cepa doadora (*mcr-1* positiva) e 100µL da cepa receptora *E. coli* J53. Foram então centrifugados por 5min a 10000rpm a 4°C, em centrifuga refrigerada. O sobrenadante foi então descartado e adicionado 100µL de caldo LB. O conteúdo foi então homogeneizado com auxílio de uma micropipeta. Em uma placa de ágar LB, foi adicionada uma membrana de 0,22µm e adicionados 100µL da suspensão bacteriana homogeneizada anteriormente sobre a membrana. A placa foi então incubada a 37°C por 18 a 24h em estufa com meio de cultura para baixo. Após a incubação a membrana foi retirada da placa de ágar LB, com auxílio de uma pinça e colocada no tubo Falcon de 50mL (contendo 5mL de caldo LB). A suspensão foi então submetida à agitação em vórtex até que ocorresse o despreendimento do crescimento bacteriano da membrana. Com auxílio de uma alça de Drigalski, foi inoculado 100µL da suspensão bacteriana em uma placa de LB contendo 1µg/L de polimixina e 1mg/mL de azida sódica. As placas foram então

incubadas por 18h a 24h a 37°C em estufa e a observação do crescimento bacteriano foi então verificada.

Os transconjugantes, foram submetidos a técnica de PCR para confirmação da presença do gene *mcr-1*.

4.7 Pesquisa de ESBL fenotípica e genotípica

Para realização dos testes fenotípicos para ESBL foram realizados testes de disco combinado. Esse teste é baseado na utilização dos discos de antimicrobianos de ceftazidima (30µg) e cefotaxima (30µg) isoladamente e em associação com ácido clavulânico 1000 µg/mL (Figura 4) conforme recomendado pelo CLSI. A produção de ESBL foi verificada pelo aumento (≥ 5 mm) no diâmetro do halo de inibição dos discos contendo o antibiótico em combinação com o ácido clavulânico se comparados ao mesmo antibacteriano sem a presença deste inibidor.

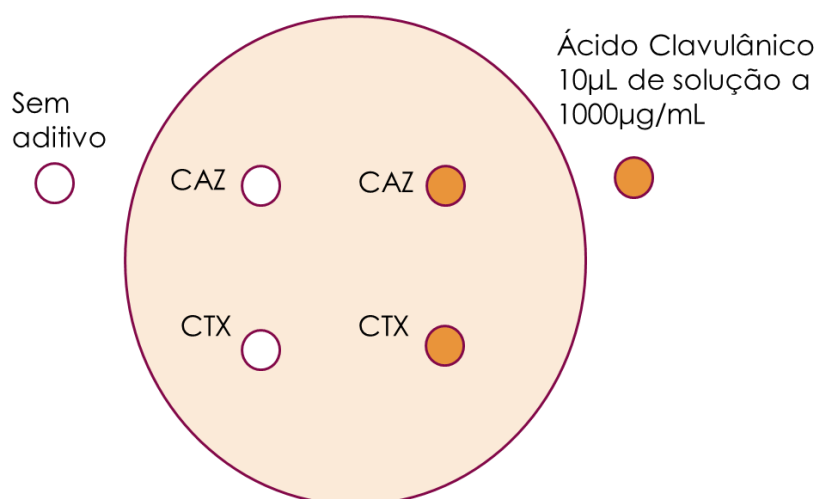


Figura 4. Representação esquemática da montagem do teste fenotípico para pesquisa de ESBL pelo método de disco combinado.

^aCAZ: Disco de ceftazidima 30µg; CTX: Disco de Cefotaxima 30µg.

4.7.1 Pesquisa de ESBL genotípica

Foram pesquisados os 3 genes mais importantes codificadores de ESBLs: SHV, TEM e CTX-M, já descritos anteriormente.

Tendo em vista a quantidade expressiva de isolados, para a realização da PCR foi realizado primeiramente um *screening* agrupando 4 isolados por vez.

A pesquisa dos referidos genes de resistência foi realizada através da técnica de PCR convencional, e os *primers* utilizados foram descritos por Hijazi e colaboradores (HIJAZI et al., 2016) (Tabela 2). Quando o *screening* foi positivo, o PCR

foi repetido para cada uma das amostras do *pool* em separado.

A partir da confirmação dos isolados positivos aos genes pesquisados, um novo PCR *in house* foi realizado utilizando novos *primers* (Tabela 2), seguido por purificação e sequenciamento a fim de identificar as variantes produzidas principalmente, pelos isolados TEM e SHV positivos, para confirmar a produção de ESBLs. As sequências de nucleotídeos foram analisadas e comparadas com as sequências disponíveis na base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), usando o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e também através do Geneious v.R10. Também foram comparadas com as disponíveis no banco de dados Lahey (<http://www.lahey.org/Studies/>).

4.7.1.1 Pesquisa SHV

O volume total utilizado para a realização de PCR foi de 25µL. A reação continha 1,0µL MgCl₂ 50mM(Invitrogen®), 2,5 µL de cada dNTP a 2,5mM(Ludwig®), 0,4µL de *Taq* DNA polimerase a 5U/µL (SUPER-THERM POLYMERASE, JMRHoldings®), 2,5 µL de tampão de reação 10X (Invitrogen®), 1,0µL de cada oligonucleotideo iniciador a 10mM (2µL de oligonucleotideos iniciadores F+R) (IDT®), 11,6 µL de água estéril, 5µL de extração de DNA.

A amplificação do DNA foi realizada com o Termociclador Veriti Thermal Cycler (Veriti®) de acordo com o programa que segue: ciclo de desnaturação inicial 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, anelamento 61°C por 30 segundos, extensão 72°C por 1min e uma extensão final à temperatura 72°C por 5min. Para todas as reações foi incluído controle positivo de amostras gentilmente cedidas pelo Hospital das Clínicas de Curitiba.

4.7.1.2 Pesquisa TEM e CTX-M:

O volume total utilizado para a realização de PCR foi de 25µL para a pesquisa de cada um dos genes. A reação para ambos foi a mesma, com as mesmas concentrações e mesmas condições de ciclagem: 1,8µL MgCl₂ 50mM(Invitrogen®), 2,5µL de cada dNTP a 2,5mM(Ludwig®), 0,4µL de *Taq* DNA polimerase a 5U/µL (SUPER-THERM POLYMERASE, JMRHoldings®), 2,5µL de tampão de reação 10X (Invitrogen®), 0,7µL de cada oligonucleotideo iniciador a 10mM (1,4µL de primer F+R) (IDT®), 11,4 µL de água estéril, 5µL de extração de DNA. A amplificação do DNA foi realizada com o Termociclador Veriti Thermal Cycler (Veriti®) de acordo com o

programa que segue: ciclo de desnaturação inicial 95°C por 5 min, 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, anelamento 61°C por 45 segundos, extensão 72°C por 1min e uma extensão final à temperatura 72°C por 5min. Para todas as reações foi incluído controle positivo de amostras gentilmente cedidas pelo Hospital das Clínicas de Curitiba.

Tabela 2. *Primers* e condições de PCR utilizadas para a pesquisa dos genes: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{IMP}-type, *bla*_{VIM}-type, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC}-type, *bla*_{GES}-type, *bla*_{OXA-48}, e *mcr-1*.

Classe Antimicrobianos	Genes de Resistência	Amplicon (pb)	Primers (5' - 3')	Referência
β-lactâmicos	SHV F	214	GATGAACGCTTTCCCATGATG	HIJAZI et al., 2016
	SHV R		CGCTGTTATCGCTCATGGTAA	
	TEM F	431	AGTGCTGCCATAACCATGAGTG	
	TEM R		CTGACTCCCCGTCGTGTAGATA	
	CTX-M F	593	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	
	CTX-M R		TGGGTRAARTARGTSACCAGA	
*β-lactâmicos (sequenciamento)	SHV F	795	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	DIERIKX et al., 2010
	SHV R		GATTTGCTGATTTGCTCGG	
	TEM F	964	GCGGAACCCCTATTTG	
	TEM R		ACCAATGCTTAATCAGTGAG	
	CTX-M F	585	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	
	CTX-M R		ACCAGAAAYVAGCGGBGC	
Carbapenêmicos	NDM F	82	TTGGCCTTGCTGTCCTTG	MONTEIRO et al., 2012
	NDM R		ACACCAGTGACAATATCACCG	
	IMP F	120	GAGTGGCTTAATTCTCRATC	
	IMP R		AACTAYCCAATAYRTAAC	
	OXA-48 F	177	TGTTTTTGGTGGCATCGAT	
	OXA-48 R		GTAAMRATGCTTGGTTTCGC	
	VIM F	382	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	
	VIM R		AATGCGCAGCACCAGGATAG	
	GES F	594	CTATTACTGGCAGGGATCG	
	GES R		CCTCTCAATGGTGTGGGT	
	KPC F	785	TCGCTAAACTCGAACAGG	
	KPC R		TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC	
Lipopeptídeo	MCR F	259	CGGTCAGTCCGTTTGTTT	LIU et al., 2016
	MCR R		CTTGGTCGGTCTGTAGGG	

4.8 Detecção dos produtos de PCR

Os produtos da amplificação de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE com adição de 0,1µL/mL de corante SYBR Safe DNA Gel Stain 10.000X (Invitrogen®). Após 25min de corrida eletroforética o gel foi observado em transiluminador. A presença dos fragmentos de 214pb, 431pb, 593pb, e 259pb foram considerados positivos para os genes: *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, e *mcr-1*, respectivamente.

4.9 Testes genotípicos para pesquisa de carbapenemases

A detecção da presença dos genes *bla_{IMP}*-type, *bla_{VIM}*-type, *bla_{NDM-1}*, *bla_{KPC}*-type, *bla_{GES}*-type, *bla_{OXA-48}*, foi realizada através da técnica de PCR em Tempo Real utilizando a tecnologia de curva de desnaturação de alta resolução por multiplex (*Multiplex HRM Real Time PCR*) adaptada de Monteiro e colaboradores (MONTEIRO et al., 2012). O DNA foi extraído por lise térmica conforme descrito no item 4.5. Cada 12,5µL do mix do PCR continha 6,25µL de MeltDoctor™ HRM Master Mix (Applied Biosystems), 5,5 µL primers (0,5µL dos primers: GES, KPC, NDM, OXA, VIM e 3µL de IMP), 0,25 µL de água ultrapura para PCR e 0,5µL de DNA. As condições de reação foram: 95°C 5 min, 35 ciclos (95°C 20s, 54°C 45s, 72°C 30s), passos da curva de desnaturação (*Melt curve step*) de 65°C com incremento de 0,1°C/s até 95°C, com aquisição de fluorescência a cada 1s. O equipamento utilizado foi o Real Time PCR StepOne® (Applied Biosystems®). O controle negativo utilizado foi água livre de RNase e DNase e os controles positivos foram: *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) A28008 (KPC+), *P. aeruginosa* 395 (IMP+), *P. aeruginosa* 81-11963A (VIM+), *K. pneumoniae* NCTC BAA2146 (NDM-1+), *P. aeruginosa* 48-8896A (GES+) e *K. pneumoniae* 68-5227A (OXA-48+), portadores dos respectivos genes de resistência, gentilmente cedidas pelo Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) da Escola Paulista de Medicina. Os resultados foram dados pelas curvas de desnaturação dos genes testados. Esta técnica foi realizada no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em parceria com o Laboratório de Resistência Bacteriana (LABRESIS). Os *primers* e características dos amplicons encontram-se descritos na Tabela 2.

4.10 Macrorestrição do DNA e eletroforese em gel de campo pulsado

Os isolados bacterianos foram primeiramente repicados para o Ágar

MacConkey e incubados *overnight* a 37°C. Após esta etapa, colônias foram então transferidas para caldo Mueller Hinton (KASVI) e incubadas por 18 a 24h na estufa a 37°C.

A concentração dos microrganismos foi padronizada, através da leitura em espectrofotômetro, conforme instruções do protocolo do PulseNet. 1mL do crescimento bacteriano foi transferido para um eppendorf e centrifugado a 12000rpm por 20min. Após esta centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em 1mL de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,8), homogeneizado e novamente centrifugado a 12000 rpm por 20min e o sobrenadante novamente desprezado. Após estas etapas, o sobrenadante foi novamente ressuspenso em 400µL de TE e homogeneizado no vórtex. Os tubos foram então colocados com a suspensão bacteriana no banho maria a 37°C para posterior adição à agarose e confecção dos blocos.

Para a confecção dos blocos (plugs) foi utilizada água ultrapura (Milli-Q) e a concentração do gel de agarose foi de 2%. Após a sua preparação, foi colocado em banho maria (BM) a 56°C.

A partir disso foram transferidos então 500µL da agarose do banho a 56°C, para os tubos com 400µL da suspensão bacteriana (do banho a 37°C). Foi realizada a homogeneização com a pipeta e transferida toda a suspensão para os moldes (moldes próprios), evitando a formação de bolhas. Os moldes foram deixados na geladeira por 30min. Após o endurecimento dos blocos, foi retirado o excesso e os blocos foram empurrados com cuidado, para dentro de um tubo falcon e adicionada a solução de lise (3,5mL de tampão de lise (1M NaCl - 10mM Tris pH 8,0 - 200mM Na₂-EDTA – 0,5% N-Laurilsarcosina (*N-Lauroylsarcosine sodium salt*) e 0,2% Dodecil Sulfato de Sódio (*Deoxycholic acid sodium salt*) e 70µL de lisozima a 50mg/mL). Os tubos foram então incubados, contendo os blocos e a solução de lise no BM a 37°C por ±24h. Após este período a solução de lise foi desprezada com uma pipeta *pasteur* e a digestão proteica foi então realizada com ação de proteinase K através da adição da solução ESP (3,5mL de tampão ES (0,5M EDTA – 1% sarcosina e 114µL de Proteinase K 20mg/mL), que foi adicionada aos tubos contendo os blocos que permaneceram no BM a 56°C por ±24h. Este procedimento foi novamente repetido, desprezando-se a solução anterior e novamente adicionando uma nova solução ESP que foi incubada em BM a 56°C por mais 24h.

Após as etapas de lise e digestão, realizou-se a lavagem dos blocos, que foi realizada a temperatura ambiente sob agitação (57rpm/min) uma vez com água Milli-Q, durante 15min e seis vezes com tampão TE, por 30min. A extração do DNA total foi realizada nos blocos de agarose previamente preparados, os quais foram submetidos à digestão com a enzima *Xba*I (Thermo Scientific, EUA).

Os tubos foram incubados com a enzima a 37°C por 18 a 24h em BM. Antes da corrida, os plugs foram retirados e colocados numa placa de petri e sacados com papel filtro.

Para a realização da corrida eletroforética foi preparado gel de agarose 1,0% com tampão TBE 0,5X Trisborato - EDTA (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,089 M; EDTA, 0,002 M). Cada plug retirado do eppendorff foi posto em um dos poços do gel de corrida. Os poços foram recobertos com o gel de agarose. A eletroforese foi realizada no sistema CHEF DR-II (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA), seguindo os padrões de variação de corrente elétrica inicial 5 segundos, tempo final 30 segundos e tempo de corrida de 23 horas à 12°C e utilizando uma corrente elétrica de 200 volts (6V/cm). O marcador Lambda Ladder PFG Marker foi utilizado para comparar o tamanho dos fragmentos, sendo adicionado na primeira e na última posições do gel. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (2µg/mL, Sigma) por uma hora e descorado em água destilada, e então fotografado sob luz ultravioleta. Os perfis migratórios obtidos após a fotografia do gel foram analisados visualmente pelo coeficiente de similaridade de Dice, com 1,0% de otimização e tolerância. Os perfis foram agrupados usando média aritmética não-ponderada (UPGMA) para construção de dendrogramas no software BioNumerics (Applied Maths, A., USA). Isolados apresentando similaridade >80% foram considerados relacionados ao mesmo grupo.

Todos os isolados *mcr-1* positivos foram submetidos a esta técnica, a fim de investigar sua relação genética.

4.11 Sequenciamento completo do genoma

O sequenciamento completo do genoma bacteriano de 4 isolados *mcr-1* positivos foi realizado através da plataforma de sequenciamento de nova geração (NGS) Illumina MiSeq. A extração total do DNA foi realizada através de kit comercial HiYield™ Genomic DNA Mini Kit (Real Genomics™). As leituras obtidas foram montadas usando o Software A5.2 e os contigs foram anotados manualmente através

do Geneious v. R9. A identificação de genes de resistência e de plasmídeos foi realizada usando ResFinder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder>; usando um limiar de 98% para identificação do gene) e PlasmidFinder (95% de limiar para identificação da sequência), respectivamente. A determinação das STs foi realizada através do método *in silico* utilizando o esquema de Achtman MLST (*Multilocus Sequence Typing*).

Um fluxograma de todos os testes realizados com as amostras está disposto abaixo.

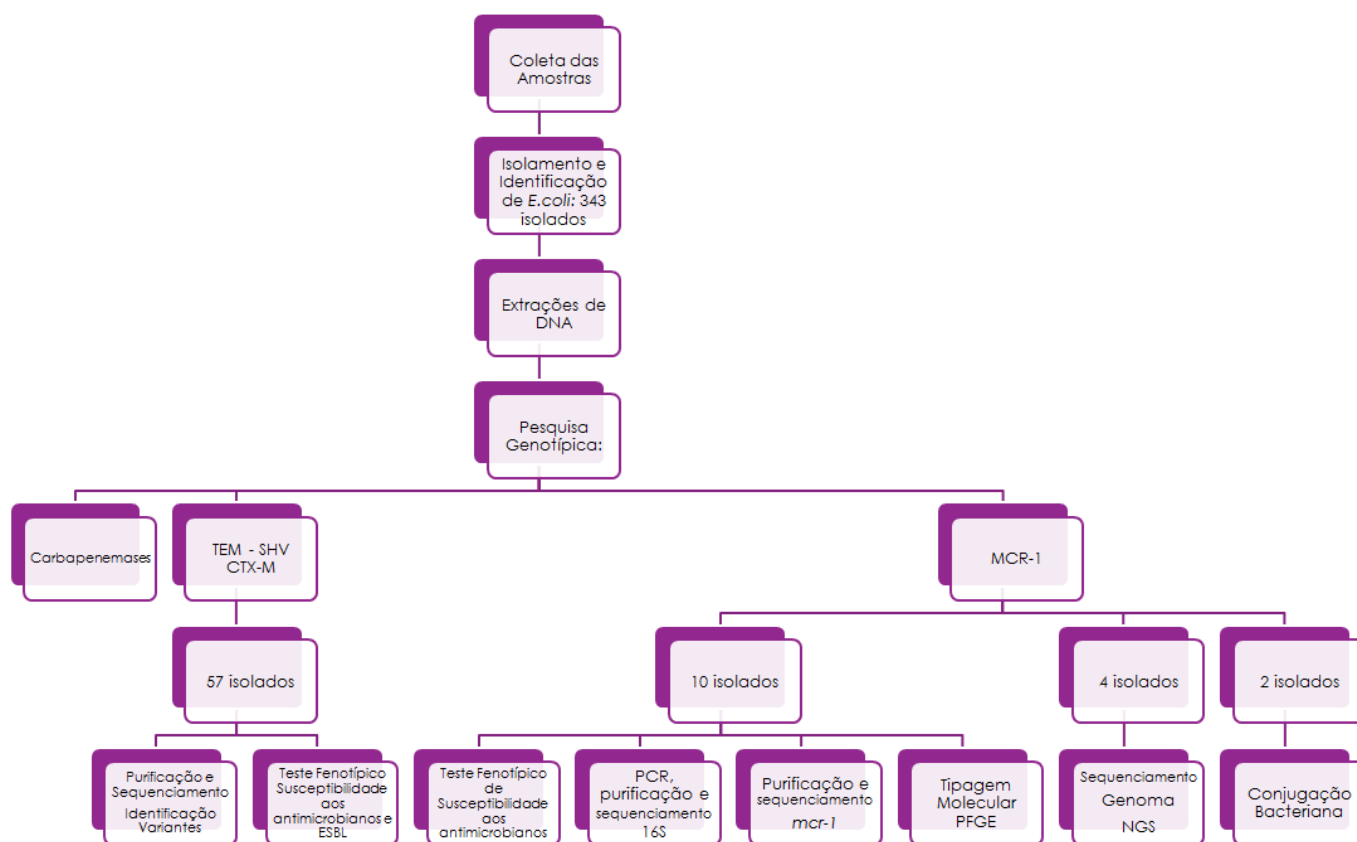


Figura 5. Fluxograma relativo aos testes realizados com as amostras.

5. ASPECTOS ÉTICOS

Foram respeitados os preceitos legais da Comissão de Ética no Uso de Animais–CEUA/UFRGS, conforme o disposto na Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 estabelecidos para pesquisa com animais. O Projeto de nº 29445 foi submetido e aprovado junto à CEUA-UFRGS (ANEXO C).

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação do consumo de antimicrobianos

Conforme Boletins Sanitários dos lotes dos animais (ANEXO B), todas as aves receberam os mesmos antimicrobianos como promotores de crescimento durante toda a sua vida (42 dias em média) (Tabela 3). Apenas aos animais dos lotes 10 e 11 foi administrada doxiciclina com finalidade terapêutica. A maioria dos antibióticos utilizados é de uso estritamente veterinário. Exceção se faz à bacitracina que é utilizada na medicina humana somente em formulações tópicas e a doxiciclina que é um antibiótico da classe das tetraciclinas também utilizado na medicina humana em formulações orais.

Tabela 3. Informações dos Boletins Sanitários referente ao uso de antimicrobianos dos animais em estudo.

Lotes	N ^a	Data coleta	Nicarbazina ^b e Narasina ^c		Bacitracina ^d		Salinomicina ^e Avilamicina ^f		Doxiciclina ^g	
			Data Início	Data Fim	Data Início	Data Fim	Data Início	Data Fim	Data Início	Data Fim
1	20.000	10/08	30/06	19/07	30/06	19/07	21/07	04/08	N/A ^h	
2	16.800	10/08	29/06	18/07	29/06	18/07	20/07	04/08	N/A	
5	13.400	26/08	14/07	30/07	14/07	30/07	31/07	20/08	N/A	
6	12.800	26/08	16/07	01/08	16/07	01/08	03/08	20/08	N/A	
7	12.800	26/08	16/07	01/08	16/07	01/08	03/08	20/08	N/A	
8	13.400	26/08	16/07	01/08	16/07	01/08	03/08	20/08	N/A	
9	30.000	10/09	29/07	14/08	29/07	14/08	16/08	04/09	N/A	
10	21.850	10/09	31/07	19/08	31/07	19/08	21/08	04/09	01/09	03/09
11	21.850	10/09	31/07	19/08	31/07	19/08	21/08	04/09	01/09	03/09
12	24.800	23/09	12/08	31/08	12/08	31/08	02/09	17/09	N/A	
13	11.700	23/09	11/08	30/08	11/08	30/08	01/09	17/09	N/A	
14	11.700	23/09	11/08	30/08	11/08	30/08	01/09	17/09	N/A	
15	6.300	23/09	12/08	31/08	12/08	31/08	02/09	17/09	N/A	
16	9.900	28/10	17/09	06/10	17/09	06/10	07/10	22/10	N/A	
17	9.900	28/10	17/09	06/10	17/09	06/10	07/10	22/10	N/A	
18	18.500	28/10	15/09	04/10	15/09	04/10	06/10	22/10	N/A	
19	18.500	28/10	15/09	04/10	15/09	04/10	06/10	22/10	N/A	

Período de carência: ^aN: número de animais em cada lote; ^{b,c}10dias; ^dsem carência; ^{e,f,g}5 dias; ^hN/A: Droga não administrada

6.2 Pesquisa genotípica e fenotípica de ESBLs

Todos os isolados foram investigados para a presença dos genes CTX-M, SHV e TEM, sendo que 57 (16,6%) foram positivos para pelo menos um deles (Figura 6 e 7).

CP CN A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20 A21



Figura 6. Gel de agarose do resultado do PCR para o gene *bla*_{CTX-M} (*screening* com *pool* de amostras). *CP: Controle positivo da reação; CN: Controle Negativo da reação; A1 a A21 amostras realizadas com 4 DNAs em cada reação.

S S1 S2 S3 S4 C C1 C2 C3 C4 T T1 T2 T3 T4 T5

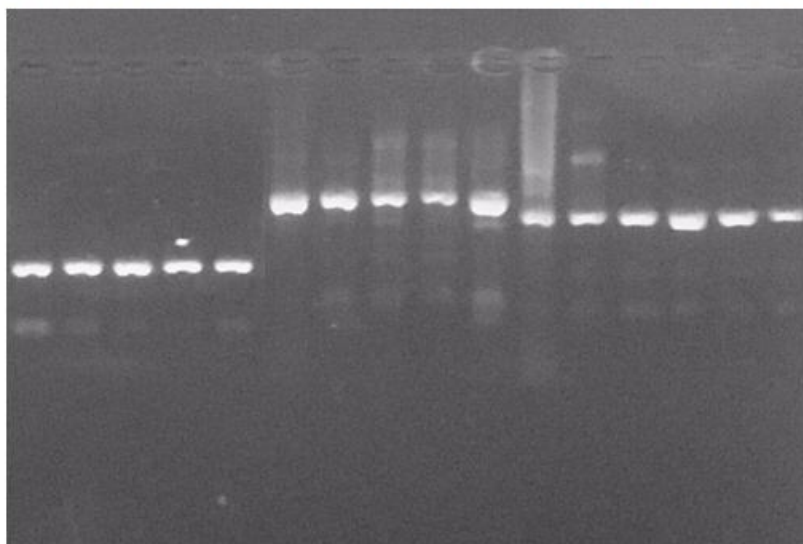


Figura 7. Gel de agarose do resultado do PCR realizado com as amostras individuais para os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM}. *S: Controle positivo SHV, S1 à S4 amostras individuais; C: Controle positivo CTX-M, C1 à C4 amostras individuais; T: controle positivo TEM, T1 a T5 amostras individuais.

A distribuição dos genes encontrada foi: 3 isolados positivos para SHV (5,2%), 18 para CTX-M (31,6%), 30 para TEM (52,6%) e 6 isolados (10,5%)

apresentaram CTX-M e TEM concomitantemente (Tabela 4).

Os resultados do sequenciamento demonstraram que todos os isolados positivos ao gene TEM foram produtores da enzima TEM-1, que possuem como substrato preferido penicilinas e cefalosporinas, não sendo produtores de ESBLs.

27 isolados foram produtores de ESBLs. Os isolados SHV positivos apresentaram duas variantes, SHV 18 e SHV 2a (Tabela 4) produtoras de β -lactamases de espectro estendido e 23 isolados foram portadores do gene CTX-M pertencentes ao grupo CTX-M-2 e um isolado portava o gene CTX-M-8 (Tabela 4).

No teste fenotípico para pesquisa de ESBL, 25 isolados (44%) foram positivos, e em 22 destes o substrato que detectou a produção de ESBL foi a cefotaxima. De todos positivos nos testes fenotípicos, 22 (88%) confirmaram a presença do gene CTX-M por PCR.

Das cepas produtoras de ESBLs, mais de 51% (Tabela 4) concentraram-se nos lotes 18 e 19, oriundos do mesmo produtor "N".

Os resultados demonstraram que mais de 67% dos isolados puderam ser agrupados em 8 perfis de resistência (Tabela 4), enquanto 19 isolados apresentaram perfis distintos. Os perfis de resistência mais prevalentes foram: Perfil 1 com 11 ocorrências (19%); Perfil 2, com 9 ocorrências (16%); Perfil 3 e 4 com 4 ocorrências cada (14% juntos); Perfis 5 e 6 com 3 ocorrências cada (10% juntos) e o Perfil 7 e 8 com 2 ocorrências cada (8% juntos).

O percentual de isolados multirresistentes (MDR) dentro deste grupo foi bastante preocupante (Tabela 4), já que 56 isolados (98%) foram resistentes a pelo menos 3 classes de antibióticos conforme a classificação de MAGIORAKOS e colaboradores, 2012.

Foi observado que 100% dos isolados foram resistentes a ampicilina, mas preservaram 100% de sensibilidade à amicacina e meropenem.

Tabela 4. Características dos isolados positivos aos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}.

Data Coleta	Isolado	Lote	Produtor	Genes de Resistência Encontrados	Perfil de Resistência dos Isolados ^{a,b}	Teste Fenotípico ESBL	
						CAZ/AC ^c	CTX/AC
10/ago	31	1	G	CTX-M-2 ^d	CN, FEP, DO, AMP, SXT, CIP, CTX	+	+
	32	1	G	TEM-1	AMP, SXT	-	-
	33	1	G	TEM-1	Perfil 4	-	-
	20	2	H	SHV-18	Perfil 1	-	-
	24	2	H	TEM-1	Perfil 5	-	-
26/ago	79	5	I	CTX-M-2 ^d	CN, SAM, FEP, AMP, SXT, CIP, CAZ, CTX	+	+
	82	5	I	TEM-1	CN, DO, AMP, SXT, CIP, CTX	-	-
	83	5	I	TEM-1	Perfil 1	-	-
	113	7	J	CTX-M-2 ^d , TEM	CN, DO, AMP, AMC, CIP, CAZ	-	-
	142	8	K	CTX-M-1	SAM, FEP, DO, AMP, CIP, CTX	-	+
10/set	181	10	Y	CTX-M-2 ^d	SAM, FEP, DO, AMP, SXT, AMC, CIP, CTX	-	+
	186	10	Y	SHV-2a	Perfil 7	-	-
	187	10	Y	CTX-M-2 ^d	Perfil 8	+	-
	204	11	Y	TEM-1	Perfil 1	-	-
	215	11	Y	TEM-1, MCR-1	SAM, DO, AMP, SXT, AMC, CIP, CAZ	+	-
23/set	271	12	X	TEM-1	Perfil 6	-	-
	287	12	X	TEM-1	Perfil 1	-	-
	288	12	X	TEM-1	DO, AMP, SXT	-	-
	296	12	X	CTX-M-8	FEP, DO, AMP, SXT, CIP, CTX	-	+
	299	13	L	TEM-1	Perfil 1	-	-
	300	13	L	SHV-2a	Perfil 8	-	+
	253	15	Z	TEM-1	DO, AMP, SXT, AMC	-	-
	257	15	Z	CTX-M-2 ^d	CN, SAM, FEP, AMP, SXT, CTX	-	+
	279	15	Z	TEM, MCR-1	Perfil 5	-	-
	280	15	Z	CTX-M-2 ^d , TEM-1	CN, FEP, DO, AMP, SXT, AMC, CAZ, CTX	+	+
	281	15	Z	TEM-1	DO, AMP, SXT, CIP, CAZ, CTX	-	-
	284	15	Z	TEM-1	Perfil 4	-	-
	290	15	Z	TEM-1	Perfil 3	-	-
291	15	Z	TEM-1	Perfil 3	-	-	
294	15	Z	TEM-1	Perfil 5	-	-	
28/out	315	16	M	TEM-1	Perfil 1	-	-
	316	16	M	TEM-1	Perfil 1	-	-
	318	17	M	CTX-M-2 ^d	SAM, FEP, DO, AMP, SXT, AMC, CAZ, CTX	+	+
	397	17	M	TEM-1	Perfil 1	-	-
	401	17	M	TEM-1	Perfil 3	-	-
	407	17	M	TEM-1	Perfil 1	-	-

Data Coleta	Isolado	Lote	Produtor	Genes de Resistência Encontrados	Perfil de Resistência dos Isolados ^{a,b}	Teste Fenotípico ESBL	
						CAZ/AC ^c	CTX/AC
	334	18	N	CTX-M-2 ^d	Perfil 4	+	-
	335	18	N	CTX-M-2 ^d	CN, SAM, FEP, DO, AMP, SXT, AMC, IMP, CIP, CAZ, CTX	-	+
	336	18	N	CTX-M-2 ^d	Perfil 2	-	+
	338	18	N	CTX-M-2 ^d	Perfil 2	-	+
	340	18	N	CTX-M-2 ^d , TEM-1	Perfil 2	-	+
	342	18	N	TEM-1	Perfil 1	-	-
	343	18	N	CTX-M-2 ^d	SAM, FEP, DO, AMP, SXT, AMC, CIP, CAZ, CTX	-	+
	346	18	N	CTX-M-2 ^d , TEM-1	CN, SAM, FEP, DO, AMP, SXT, AMC, CIP, CTX	-	+
	347	18	N	CTX-M-2 ^d	Perfil 2	-	+
	349	18	N	TEM-1	Perfil 7	-	-
	350	18	N	CTX-M-2 ^d	Perfil 4	-	-
	351	18	N	CTX-M-2 ^d	Perfil 2	+	+
	331	19	N	TEM-1	Perfil 1	-	-
	354	19	N	TEM-1	Perfil 6	-	-
	355	19	N	TEM-1	Perfil 6	-	+
	356	19	N	CTX-M-2 ^d , TEM-1	Perfil 2	-	+
	357	19	N	CTX-M-2 ^d , TEM-1	Perfil 2	+	+
	361	19	N	TEM-1	CN, SAM, DO, AMP, SXT, AMC, IMP, CIP, CAZ, CTX	-	-
	366	19	N	CTX-M-2 ^d	Perfil 2	-	+
	368	19	N	TEM-1	Perfil 3	-	-
	384	19	N	CTX-M-2 ^d	Perfil 2	-	+

^aDiscos de antibióticos utilizados: CN 10µg – Gentamicina, SAM 20µg – Ampicilina/Sulbactam, FEP 30µg – Cefepima, DO 30µg – Doxiciclina, AMP 10µg – Ampicilina, SXT 25µg – Sulfametoxazol/Trimetropin, AMC 30µg – Amoxicilina/Ácido Clavulânico IPM 10µg – Imipenem CIP 5µg – Ciprofloxacino, CAZ 30µg – Ceftazidima e CTX 30µg – Cefotaxima.

^b**Perfil de Resistência:** **Perfil 1:** SAM, DO, AMP, SXT, AMC, CIP, CAZ, CTX; **Perfil 2:** CN, SAM, FEP, DO, AMP, SXT, AMC, CIP, CAZ, CTX; **Perfil 3:** CN, SAM, DO, AMP, SXT, AMC, CIP, CAZ, CTX; **Perfil 4:** DO, AMP, SXT, AMC, CIP, CAZ, CTX; **Perfil 5:** SAM, DO, AMP, SXT, AMC, CAZ, CTX; **Perfil 6:** CN, SAM, AMP, SXT, AMC, CIP, CAZ, CTX; **Perfil 7:** CN, DO, AMP, SXT, AMC, CIP, CAZ, CTX; **Perfil 8:** DO, AMP, SXT, CIP

^cAC: ácido clavulânico;

^dGrupo CTX-M-2.

6.3 Pesquisa genotípica de *mcr-1* e perfil de susceptibilidade às polimixinas

Todos os isolados foram investigados para a presença do gene *mcr-1* e foram identificados 10 isolados (3,0%) positivos para este gene pela técnica de PCR. Os fragmentos amplificados foram submetidos a sequenciamento para confirmação da identidade genética do gene *mcr-1*. Além disso, foi realizado PCR do 16S e posterior sequenciamento desta região confirmando a identificação de *Escherichia coli*

nestes isolados.

Entre estes isolados, 8 apresentaram CIM de 2mg/L para polimixina B e 2 isolados apresentaram CIM de 1mg/L e 0,25mg/L. Para a colistina, 5 isolados apresentaram CIM de 2mg/L, 4 isolados tiveram CIM de 1mg/L e um isolado apresentou CIM de 0,5mg/L. De acordo com os critérios do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) todos os isolados são considerados sensíveis à polimixina B e colistina cujo ponto de corte é definido como > 2mg/L.

O perfil de susceptibilidade para os demais antimicrobianos está representado na Tabela 5. Dentre os isolados positivos para o gene *mcr-1*, 2 apresentaram co-produção do gene TEM-1. (Tabela 4).

Para confirmar a localização plasmidial do gene *mcr-1*, dois isolados foram submetidos a conjugação com a cepa *E. coli* J53. Os transconjugantes apresentaram resultados positivos no PCR para o gene *mcr-1* e apresentaram CIM de polimixina B de 2 mg/L.

Todos os isolados *mcr-1* positivos foram 100% susceptíveis a piperacilina/tazobactam, aos aminoglicosídeos, aos carbapenêmicos e a cefalosporina de 4ª geração. Entretanto, todos apresentaram resistência aos antibióticos ceftazidima, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina e sulfametoxazol/trimetropin.

Tabela 5. Características dos isolados de *E. coli* positivos para *mcr-1*.

Grupo Clonal (n)	ST	ID	Lote	Produtor	CIM Polimixina B (mg/L)	CIM Colistina (mg/L)	^a Susceptibilidade aos Antimicrobianos													
							TZP	AMC	AK	AMP	SAM	FEP	DO	CN	SXT	CIP	IPM	MEM	CAZ	CTX
A (1)	-	274	12	X	0,25	0,5	S ^b	R	S	R	R	S	R	S	R	I	S	S	R	R
B (1)	ST38	295	15	Z	1	1	S	R	S	R	I	S	R	S	R	S	S	S	R	R
C (1)	ST 58	215	11	Y	2	2	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	I
D (5)	ST 2491	249	15	Z	2	2	S	R	S	R	R	S	I	S	R	S	S	S	R	I
	-	251			2	2	S	R	S	R	R	S	I	S	R	S	S	S	R	R
	-	252			2	1	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
	-	254			2	1	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
	-	283			2	2	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	I
E (1)	-	221	12	X	2	2	S	R	S	R	I	S	R	S	R	S	S	S	R	R
F (1)	ST 2491	279	15	Z	2	1	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R

^aTZP 110µg – Tazobactam/Piperacilina, AMC 30µg – Amoxicilina/Ácido Clavulânico, AMP 10µg – Ampicilina, SAM 20µg – Ampicilina/Sulbactam, FEP 30µg – Cefepima, DO 30µg – Doxiciclina, CN 10µg – Gentamicina, SXT 25µg – Sulfametoxazol/Trimetropin, CIP 5µg – Ciprofloxacino, IPM 10µg – Imipenem e MEM 10µg – Meropenem, CAZ 30µg – Ceftazidima e CTX 30µg – Cefotaxima. ^bR – Resistente; S – Sensível; I – Intermediário.

6.4 Tipagem molecular

Os 10 isolados positivos para o gene *mcr-1* foram tipados através da macrorestrição do DNA total seguida de eletroforese em gel de campo pulsado através do PFGE. Cinco isolados, foram considerados clonalmente relacionados enquanto os outros cinco isolados foram classificados em distintos grupos clonais (Figura 8 e 9). Os isolados que pertencem ao mesmo clone foram obtidos do mesmo lote de aves (lote 15).

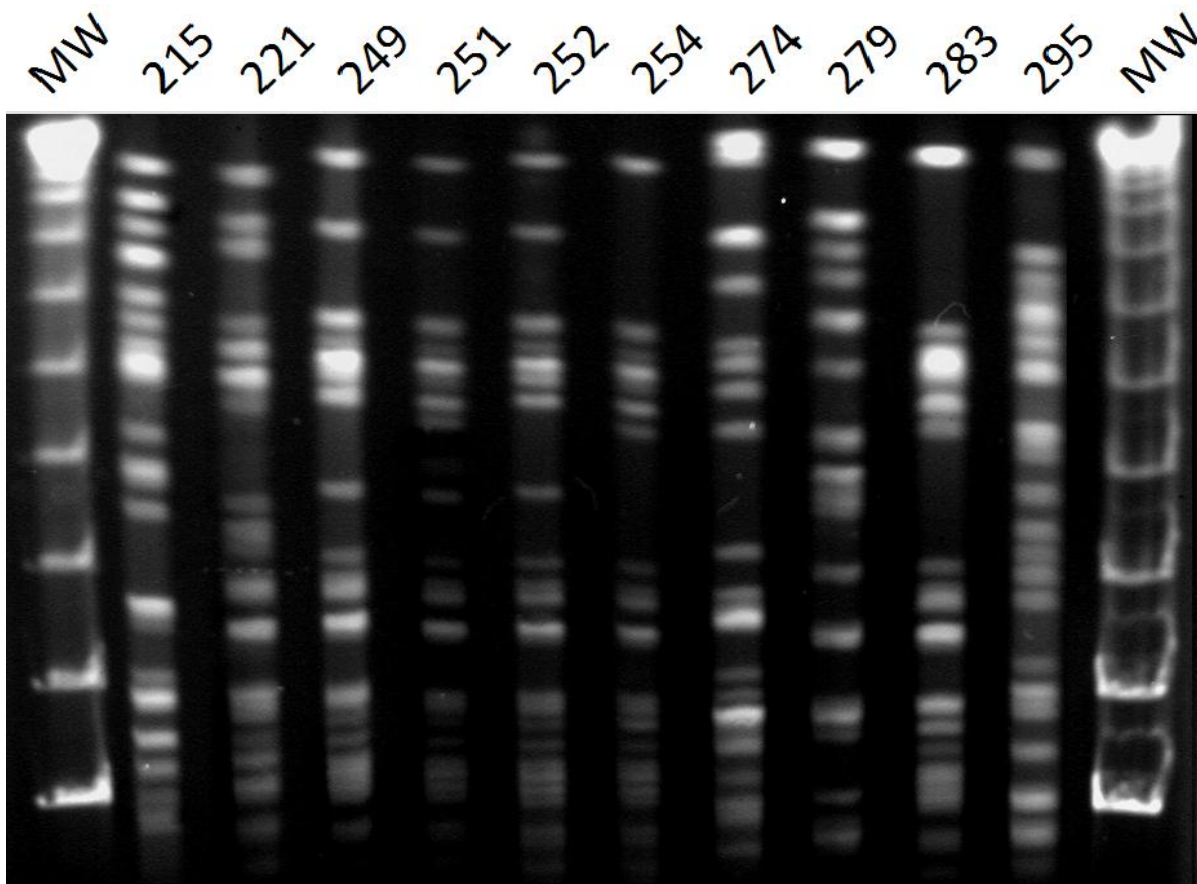


Figura 8. PFGE dos 10 isolados positivos para o gene *mcr-1*.

*MW – marcador de peso molecular; 215-295 isolados de *E. coli mcr-1* positivos.

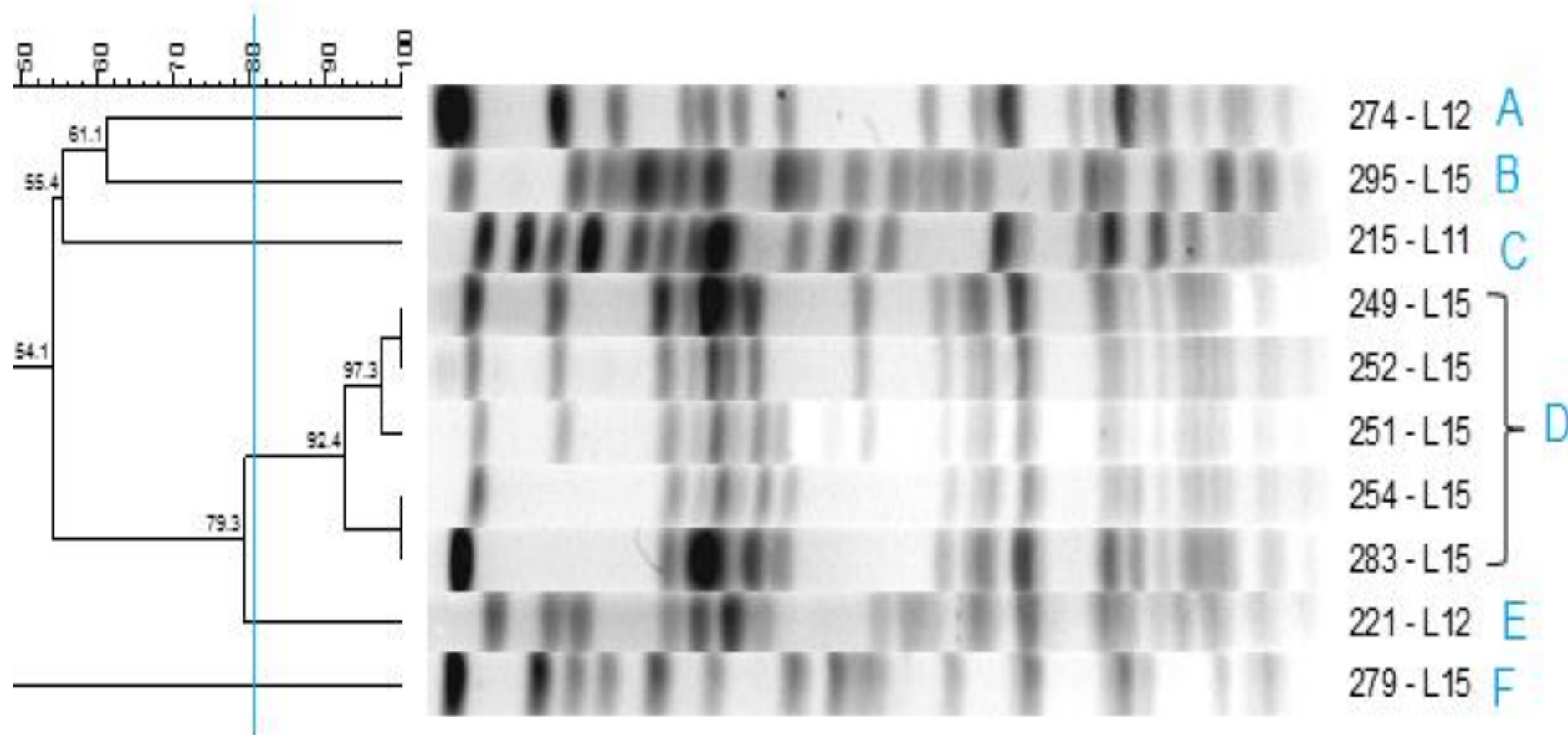


Figura 9. Dendrograma dos isolados de *E. coli* positivos para o gene *mcr-1*. A análise foi feita através do método de agrupamento usando média aritmética não-ponderada (UPGMA). Similaridade Genética foi calculada pelo coeficiente de Dice. Cut-off de 80% de similaridade foi usado para definição dos Grupos clonais (linha).

6.5 Sequenciamento completo do genoma

A partir da análise de tipagem molecular realizada através do PFGE para os isolados *mcr-1* positivos, 4 isolados pertencentes a clones e lotes diferentes de animais foram submetidos ao sequenciamento completo do genoma.

A tipagem molecular realizada através do método *in silico* possibilitou a visualização de 3 sequências tipo distintas nos 4 isolados selecionados (Tabela 5).

Todos os isolados avaliados carregaram importantes genes de resistência aos antimicrobianos tais como *CMY-2* e *TEM-1*, *aadA1*, *aph(3')-Ia*, *strA* e *strB*, *QnrB*, *tet(A)* e *sul2*, entretanto nenhum deles estava no mesmo plasmídeo que apresentou o gene *mcr-1*. Os tipos de plasmídeos que apresentaram o gene *mcr-1* foram *Incl1* (1 isolado) e *IncX4* (3 isolados).

6.6 Pesquisa genotípica de resistência aos carbapenêmicos

Com relação à pesquisa de carbapenemases realizada através do PCR em tempo real, não foi encontrado nenhum isolado positivo para os genes avaliados.

7. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo revelaram dados substanciais sobre o perfil dos isolados de *E. coli* oriundos de aves de produção. Em nossa pesquisa, 343 isolados cresceram em presença de ceftazidima, sugerindo altos níveis de resistência, o que chama atenção pois os animais não receberam cefalosporinas durante a sua vida (Tabela 3), apesar desta prática ser bem comum inclusive em outros países, favorecendo a disseminação de cepas produtoras de ESBL (CARATTOLI, 2008; COQUE; BAQUERO; CANTON, 2008; JORGENSEN et al., 2007; TROTT, 2013). Porém, em alguns países, como nos Estados Unidos, o uso de cefalosporinas na produção animal em diversas espécies, inclusive em frangos, está proibido desde 2012 (USFDA, 2012).

Pesquisa realizada anteriormente no Brasil, em codornas sob inspeção sanitária, demonstrou que a prevalência de resistência foi de 65% para cefalosporinas de 3ª geração (CROXEN et al., 2013).

Apesar deste crescimento em presença de ceftazidima, identificamos somente 7,9% de prevalência de genes produtores de ESBL. Este fato pode ser explicado uma vez que a resistência a este antimicrobiano pode estar associada a

outros mecanismos e outros genes codificadores de ESBLs que não foram pesquisados.

Podemos destacar o gene CMY-2 identificado em 2 isolados através do sequenciamento de nova geração. Este gene confere resistência às cefalosporinas de 3ª geração, mas é fracamente inibido pelo ácido clavulânico (HANSEN et al., 2016). CMY-2, é a mais comum AmpC plasmidial encontrada em *E. coli* (DENISUIK et al., 2013). Assim, a presença deste gene poderia justificar os nossos achados de altas taxas de resistência a ceftazidima mesmo na ausência de uma ESBL.

A ESBL mais prevalente encontrada neste estudo foi a CTX-M, presente em 24 dos 27 isolados produtores de β -lactamases de amplo espectro, seguida pela SHV, o que corrobora com estudos realizados mundialmente (D'ANDREA et al., 2013; RICE; BONOMO, 2007; ROSSOLINI et al., 2008).

As variantes encontradas, do grupo CTX-M-2 e CTX-M-8 são as principais enzimas estabelecidas na América do Sul e Brasil segundo estudos anteriores (CANTÓN; GONZALEZ-ALBA; GALAN, 2012; NOGUEIRA et al., 2015; ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016; ROSSOLINI et al., 2008; SAMPAIO; GALES, 2016).

SHV é a segunda ESBL mais prevalente no Brasil, sendo que as variantes aqui encontradas ainda não foram descritas no país (NOGUEIRA et al., 2015; SAMPAIO; GALES, 2016)

Um estudo realizado nos EUA, entre 2009 e 2011 detectou índices de prevalência de 8,1% de ESBL em *E. coli*, semelhantes aos nossos (7,9%) sendo a enzima SHV mais prevalentemente encontrada neste país (SADER; FLAMM; JONES, 2014). Enquanto na Europa a enzima mais frequentemente encontrada é CTX-M, sendo que a CTX-M-2 já foi isolada no Reino Unido a partir de amostras de carne de frango importadas do Brasil (COQUE; BAQUERO; CANTON, 2008).

Na China, CTX-M é a mais prevalente ESBL conhecida, sendo a mesma encontrada em animais de produção e causando infecções na comunidade. Neste país, o sucesso da perpetuação das ESBLs é atribuída à má qualidade da água potável e ausência de tratamento nos dejetos (HAWKEY, 2008; MOHSEN et al., 2016).

Em 2013, pesquisa realizada em 7 países europeus confirmou uma correlação positiva entre a utilização de antibióticos na medicina veterinária e presença de resistência clínica em humanos incluindo as cefalosporinas (CHANTZIARAS et al., 2014).

Nossos resultados demonstraram elevadas taxas de multirresistência (98%) entre os isolados positivos para ESBL superiores ao que Abgottspon e colaboradores encontraram em 2014, quando analisaram o perfil de multirresistência em isolados de *E. coli* resistentes a cefalosporinas provenientes de carnes de frango in natura e identificaram que 87,5% eram multirresistentes (ABGOTTSPON et al., 2014).

A resistência à ampicilina também foi superior a estudos realizados em outros países. Em isolados patogênicos de *E. coli* causadores de colisepticemia e celulite aviária no Japão (OZAWA et al., 2008), China (YANG et al., 2004), e Irã (ZAKERI; KASHEFI, 2012) os dados apontaram 77%, 79% e 58% de resistência, respectivamente, enquanto nossos dados revelaram 100% de resistência ao mesmo fármaco. No Brasil, KORB e colaboradores também encontraram isolados 100% resistentes a ampicilina em pesquisa realizada em Curitiba (KORB et al., 2015). Em parte ela está atribuída a presença de TEM-1 encontrada em mais de 10% dos isolados.

Antibióticos da classe dos carbapenêmicos não são utilizados na produção animal, o que pode justificar o fato de não ter sido encontrado nenhum gene que codifique para a presença de carbapenemases entre os isolados deste estudo.

Entretanto na Alemanha, Fischer e colaboradores encontraram um isolado de *E. coli* positivo para a carbapenemase VIM-1 numa pesquisa com 4.100 suínos oriundos de granjas produtoras, mesmo sem registro de utilização de carbapenêmicos na produção animal (FISCHER et al., 2012).

Outro estudo realizado na China em 2013 também obteve um isolado de *Acinetobacter Iwoffii* isolado de frango, positivo para *bla*_{NDM-1}. Neste estudo os antimicrobianos utilizados na produção não foram informados, contudo, o uso de carbapenêmicos em animais de produção é proibido neste país. Eles justificam que a utilização de outros β -lactâmicos não carbapenêmicos como ceftiofur e cefotaxima são extensivamente utilizados na produção animal e a sua utilização pode servir de força motriz para a seleção de cepas produtoras de carbapenemases (WANG et al., 2012).

Desde a primeira identificação do gene plasmidial *mcr-1* por Liu e colaboradores, a comunidade científica voltou sua atenção à resistência às polimixinas. Atualmente esse gene já foi reportado em mais de 30 países distribuídos nos cinco continentes, como já mencionado (XAVIER et al., 2016b). Além dos casos

reportados em animais de produção e amostras ambientais, a identificação em isolados clínicos nos EUA (MCGANN et al., 2016), Brasil (FERNANDES et al., 2016a) e Argentina (RAPOPORT et al., 2016) ganharam destaque nos últimos meses.

Fernandes e colaboradores publicaram os primeiros achados brasileiros de *mcr-1* e afirmaram em seu estudo que os animais de produção estão expostos à colistina e esse seria o motivo da emergência do gene no Brasil e no mundo. Atrelaram também a ocorrência e disseminação deste gene a viajantes, como prováveis transportadores e responsáveis em parte pela disseminação na China e Europa (FERNANDES et al., 2016b).

É verdade que além da China, países como Alemanha, Espanha e Itália, juntos, segundo EMA (2013) movimentaram mais de 360 toneladas de polimixinas na produção animal, entretanto no Brasil este número não é conhecido. Lembramos que a colistina constava na lista de aditivos autorizados do MAPA, e foi recentemente proibida (30/11/16), após a emergência e disseminação do gene *mcr* e o impacto à saúde humana (BRASIL, 2006; 2016; EMA, 2013).

Em nossa análise, afirmamos conforme documento oficial do Serviço de Inspeção Federal do país (ANEXO B) que as aves deste estudo não receberam polimixinas como aditivos alimentares nem com finalidade terapêutica (Tabela 3). A ocorrência de genes que conferem resistência às polimixinas entre isolados de animais que não foram expostos a esses antimicrobianos, geram intrigantes questionamentos. Mecanismos de ação similares entre diferentes antibióticos e a possibilidade de desenvolvimento de resistência cruzada ainda são motivos de discussão. A avoparcina é um antimicrobiano da classe dos glicopeptídeos e já foi amplamente empregado como melhorador de desempenho zootécnico em aves e suínos (SILVEIRA et al., 2006). Entretanto, é uma molécula similar à vancomicina, um importante antibiótico utilizado na prática clínica contra infecções causadas por bactérias gram-positivas. Após o surgimento das primeiras cepas de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina, seguindo o princípio da precaução, a União Europeia banuiu a sua utilização em 1997 (GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE, 2010; POETA; ANTUNES; RODRIGUES, 2005). Algo similar poderia estar ocorrendo em relação as polimixinas e a emergência do gene *mcr-1*.

A resistência à polimixina codificada por plasmídeos conjugativos que carregam genes de resistência a outros antimicrobianos confirmam a possibilidade de co-seleção de resistência. Alguns estudos tem demonstrado essa ocorrência, como

na França, onde foi confirmada a ocorrência concomitante do gene *bla*_{CTX-M-1} e *mcr-1* em 9% dos plasmídeos sequenciados (HAENNI et al., 2016a) e mais que isso, este grande plasmídeo conjugativo identificado como IncHI2-type, também conferia resistência a sulfonamidas e tetraciclinas, antimicrobianos largamente utilizados na medicina veterinária.

Reservatórios ambientais não podem ser negligenciados. A presença destes genes de resistência pode ter advindo de fontes ambientais e ter sido potencialmente transferida aos animais. Seja através de animais mantidos em ciclos de produções anteriores (NGUYEN et al., 2016) ou através de outros reservatórios. Microrganismos portadores destes genes podem ter permanecido no solo, água e camas reutilizadas. Sua propagação pode ter ocorrido através de resíduos animais não tratados, efluentes, vetores e até mesmo através de trabalhadores que circulam entre as produções animais.

Dados importantes revelaram que uma grande proporção dos isolados resistentes que causam infecções em humanos são originários de animais de produção (JAKOBSEN et al., 2010; OVERDEVEST et al., 2011). Cepas de *E. coli* isoladas de infecções humanas e de frangos na Holanda eram idênticas, provando o potencial de disseminação entre humanos e animais (OVERDEVEST et al., 2011).

No nosso estudo observamos através da tipagem molecular por PFGE, que 5 isolados pertenceram ao mesmo *cluster* (D) e foram oriundos do mesmo produtor, cuja coleta fora realizada no mesmo dia. Outros dois isolados positivos também tiveram a mesma origem de produção, mas não foram relacionados geneticamente. Esse fato desperta para as práticas usadas na criação animal sugerindo que rotinas deverão ser revistas para evitar a disseminação horizontal de outros determinantes de resistência e também de patógenos.

Já o sequenciamento completo do genoma bacteriano realizado em 4 isolados *mcr-1* positivos confirmou a existência de 3 clones distintos, ST38, ST58 e ST2491. A ST38 já foi relatada em isolados de diferentes países, inclusive carreando genes de resistência como CTX-M, OXA-48 e NDM (AL BAYSSARI et al., 2015; POIREL et al., 2011; SEKIZUKA et al., 2011). Esta ST é considerada um clone de alto risco, multirresistente e está associado a infecções do trato urinário em humanos (PITOUT, 2012; VAN DER BIJ et al., 2011). Assim, a presença desta ST em animais demonstra a circulação da mesma cepa de *E. coli* em diferentes ambientes.

A primeira identificação de isolado clínico humano portador do gene *mcr-1* no Brasil, 10 meses depois da primeira descrição deste gene em reservatórios animais na China reafirma a necessidade de ações integradas de saúde (FERNANDES et al., 2016b). Sendo as polimixinas atualmente o antibiótico de última escolha para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes a carbapenêmicos, resta preocupação no ambiente clínico, devido à falta de opções terapêuticas frente a disseminação do gene *mcr-1*.

Em Porto Alegre, já existe a circulação de *mcr-1* em isolados clínicos em *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* co-produtoras de KPC provenientes do banco de amostras de um estudo de vigilância epidemiológica dentre os anos de 2014 e 2016 do LABRESIS (dados ainda não publicados).

No Brasil, a ANVISA conduziu o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência em Frangos e o executa através de análises de carcaças de frangos congeladas, entretanto os microrganismos pesquisados são apenas *Enterococcus* e *Salmonella spp.* Apesar da existência do Programa no Brasil, não existem dados consistentes relativos a classe e quantidade de antimicrobianos utilizada na produção animal (BRASIL, 2008).

Em 2013, na Europa, 8.060 toneladas de antimicrobianos foram vendidos para utilização em animais de produção. Deste total, 37% foram da classe das tetraciclinas; 25% de penicilinas; 9,6% de sulfonamidas; 7% macrolídeos e 6% de polimixinas (EMA, 2013). Sabe-se da necessidade de manter os níveis produtivos e econômicos na produção animal, contudo, a utilização de alternativas aos antimicrobianos transcende a isto e precisa ser colocada em prática. Melhorar o status sanitário do plantel, com práticas positivas de ambiente e manejo são essenciais para atingir este objetivo sem a utilização intensiva e irracional de antibióticos.

Lundborg e colaboradores publicaram em 2015 na Índia, um trabalho demonstrando um exemplo da aplicabilidade da Saúde Única. Foram pioneiros neste projeto, aplicando a interdisciplinaridade. Enfatizaram que desde 2008 a bandeira do “One Health” foi erguida mas nada se fez de concreto no mundo no que tange a implementação de estratégias afins. Eles procuraram demonstrar como são determinantes as ações interdisciplinares para o planejamento das estratégias de vigilância (LUNDBORG et al., 2015).

A colaboração dos especialistas das mais diversas áreas possibilitará as ações no ambiente, nos animais e seres humanos.

8. CONCLUSÕES

- ✓ As aves de produção são reservatórios ambientais de genes de resistência e podem ter um papel importante na sua disseminação;
- ✓ A multirresistência apresentada pelos isolados de *E. coli* frente a importantes antimicrobianos utilizados na medicina humana e veterinária foi elevada;
- ✓ O gene *mcr-1* foi identificado na cepa ST38 que está muito relacionada com infecções humanas interligando a medicina veterinária, humana e o meio ambiente;
- ✓ Os isolados deste estudo apresentaram 100% de resistência à ampicilina;
- ✓ O gene de ESBL mais prevalente foi CTX-M;
- ✓ Não houve associação entre os genes de resistência identificados e os antimicrobianos utilizados nos animais, conforme os boletins sanitários;
- ✓ Não identificamos genes de carbapenemases entre os animais produtores de alimentos;
- ✓ A possibilidade de ocorrência de resistência cruzada não pode ser descartada, uma vez que os animais apresentaram genes de resistência a antimicrobianos para os quais não haviam sido expostos anteriormente;
- ✓ O uso massivo de antimicrobianos na medicina veterinária deve ser reavaliado, para evitar a disseminação de resistência no ambiente.

9. REFERÊNCIAS

Artigos:

- Aarestrup FM. 1999. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int J Antimicrob Agents*. 12(4):279-85.
- Abgottspon H, Stephan R, Bagutti C, Brodmann P, Hächler H, Zurfluh K. 2014. Characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from Swiss and imported poultry meat. *J Food Prot*, 77(1):112-5.
- Agerso Y, Aarestrup FM, Pedersen K, Seyfarth AM, Struve T, Hasman H. 2012. Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *J Antimicrob Chemother*. 67(3):582-8.
- Al Bayssari C, Olaitan AO, Dabboussi F, Hamze M, Rolain JM. 2015. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in fowl. *Antimicrob Agents Chemother*. 59(1):745-6.
- Alekshun MN, Levy SB. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 128(6):1037-50.
- Allen SE, Boerlin P, Janecko N, Lumsden JS, Barker IK, Pearl DL, Reid-Smith RJ, Jardine C. 2011. Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolates from wild small mammals living in swine farm, residential, landfill, and natural environments in southern Ontario, Canada. *Appl Environ Microbiol*. 77(3):882-8.
- Ambler RP. 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 289(1036):321-31.
- Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG. 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J*. 276(Pt 1):269-70.
- Aminov RI. 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol*. 11(12):2970-88.
- Anjum MF, Duggett NA, AbuOun M, Randall L, Nunez-Garcia J, Ellis RJ, Rogers J, Horton R, Brena C, Williamson S, Martelli F, Davies R, Teale C. 2016. Colistin resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from a pig farm in Great Britain. *J Antimicrob Chemother*. 71(8):2306-13
- Arpin C, Dubois V, Coulange L, André C, Fischer I, Noury P, Grobost F, Brochet JP, Jullin J, Dutilh B, Larribet G, Lagrange I, Quentin C. 2003. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother*. 47(11):3506-14.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2):71-79
- Bebell LM, Muiru AN. 2014. Antibiotic use and emerging resistance: how can resource-limited countries turn the tide? *Glob Heart*. 9(3):347-58.
- Berendonk TU, Manaia CM, Merlin C, Fatta-Kassinos D, Cytryn E, Walsh F, Bürgmann H, Sørum H, Norström M, Pons MN, Kreuzinger N, Huovinen P, Stefani S, Schwartz T, Kisand V, Baquero F, Martinez JL. 2015. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol*. 13(5):310-7.
- Blaak H, de Kruijf P, Hamidjaja RA, van Hoek AH, de Roda Husman AM, Schets FM. 2014. Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch

- recreational waters influenced by wastewater treatment plants. *Vet Microbiol.* 171(3-4):448-59.
- Burow E, Simoneit C, Tenhagen BA, Käsbohrer A. 2014. Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli*-a systematic review. *Prev Vet Med.*113(4):364-75.
- Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(3):969-76.
- Butaye P, van Duijkeren E, Prescott JF, Schwarz S. 2014. Antimicrobial resistance in bacteria from animals and the environment. *Vet Microbiol.* 171(3-4):269-72.
- Cannatelli A, Giani T, Antonelli A, Principe L, Luzzaro F, Rossolini GM. 2016. First Detection of the *mcr-1* Colistin Resistance Gene in *Escherichia coli* in Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 60(5):3257-8.
- Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 14:144-153.
- Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen Ø, Seifert H, Woodford N, Nordmann P. 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 18(5):413-31.
- Cantón R, Gonzalez-Alba JM, Galan, JC. 2012. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol.* 3:110.
- Carattoli, A. 2008. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin Microbiol Infect.* 14(1):117-23.
- Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TP, Timm LN, Da Silva RC, Falci DR, Asensi MD. 2013. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 68(12):2956-7.
- Chantziaras I, Boyen F, Callens B, Dewulf J. 2014. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J Antimicrob Chemother.* 69(3):827-34.
- Chen H, Shu W, Chang X, Chen JA, Guo Y, Tan Y. 2010. The profile of antibiotics resistance and integrons of extended-spectrum beta-lactamase producing thermotolerant coliforms isolated from the Yangtze River basin in Chongqing. *Environ Pollut.* 158(7):2459-64.
- Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H, Ito Y, Miyamoto T, Kamimura T, Shimono N, Akashi K. 2013. Community spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*: a long-term study in Japan. *J Med Microbiol.* 62(7):1038-43.
- Chouchani C, Marrakchi R, Henriques I, Correia A. 2013. Occurrence of IMP-8, IMP-10, and IMP-13 metallo-beta-lactamases located on class 1 integrons and other extended-spectrum beta-lactamases in bacterial isolates from Tunisian rivers. *Scand J Infect Dis.* 45(2):95-103.
- Conrad PA, Meek LA, Dumit J. 2013. Operationalizing a One Health approach to global health challenges. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 36 (3):211-6.
- Coque TM, Baquero F, Canton R. 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.*13(47).
- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 26(4):822-880.
- Curriero FC, Patz JA, Rose JB, Lele S. 2001. The association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994.

- Am J Public Health. 91(8):1194-9.
- D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. 2013. CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* 303(6-7):305-17.
- Dalólio FS, Moreira J, Valadares LR, Nunes PB, Vaz DP, Pereira HJ, Pires AV, Cruz PJ. 2015. Aditivos Alternativos ao uso de antimicrobianos na alimentação de frangos de corte. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS).* 5(1):86-94.
- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science.* 311 (5759):374-7.
- De Jong A, Smet A, Ludwig C, Stephan B, De Graef E, Vanrobaeys M, Haesebrouck F. 2014. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from healthy pigs and chickens (2008-2011). *Vet Microbiol.* 171(3-4):298-306.
- Denisuik AJ, Lagace-Wiens PR, Pitout JD, et al. 2013. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-, AmpC beta-lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007–11. *J Antimicrob Chemother.* 68(1):i57–65.
- Dhanji H, Murphy NM, Akhigbe C, Doumith M, Hope R, Livermore DM, Woodford N. 2011. Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase from UK river water. *J Antimicrob Chemother.* 66(3):512-6.
- Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. 2010. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol.* 145(3-4):273-8.
- Doumith M, Godbole G, Ashton P, Larkin L, Dallman T, Day M, Day M, Muller-Pebody B, Ellington MJ, de Pinna E, Johnson AP, Hopkins KL, Woodford N. 2016. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. *J Antimicrob Chemother.* 71(8):2300-5.
- Du H, Chen L, Tang YW, Kreiswirth BN. 2016. Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Lancet Infect Dis.* 16(3):287-8.
- Durso LM, Cook KL. 2014. Impacts of antibiotic use in agriculture: what are the benefits and risks? *Curr Opin Microbiol.* 19:37-44.
- Dzidic S, Suskovic J, Kos B. 2008. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology.* 46(1):11-21.
- Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. 2003. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(12):3724-32.
- Emery CL, Weymouth LA. 1997. Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center. *J Clin Microbiol.* 35 (8):2061-7.
- Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. 2012. Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect.* 18(7):646-55.
- Falgenhauer L, Waezsada SE, Yao Y, Imirzalioglu C, Käsbohrer A, Roesler U, Michael

- GB, Schwarz S, Werner G, Kreienbrock L, Chakraborty T. 2016. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect Dis.* 16(3):282-3.
- Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA, Moura Q, Pérez-Chaparro PJ, Esposito F, Sartori L, Dropa M, Matté MH, Lira DP, Mamizuka EM, Lincopan N. 2016a. First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the *mcr-1* Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a Human Infection in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 60(10):6415-7.
- Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, Lopes R, Otutumi LK, Gonçalves DD, Dropa M, Matté MH, Monte DF, Landgraf M, Francisco GR, Bueno MF, Garcia DO, Knöbl T, Moreno AM, Lincopan N. 2016b. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro Surveill.* 21(17).
- Finley RL, Collignon P, Larsson DGJ, McEwen SA, Li X, Gaze WH, Reid-Smith R, Timinouni M, Graham DW, Topp E. 2013. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clin Infect Dis.* 57(5):704-10.
- Fischer J, Rodríguez I, Schmogger S, Friese A, Roesler U, Helmuth R, Guerra B. 2012. *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. *J Antimicrob Chemother.* 67(7):1793-5.
- Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 14 (4):836-71.
- Forsberg KJ, Patel S, Gibson MK, Lauber CL, Knight R, Fierer N, Dantas G. 2014. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. *Nature.* 509(7502):612-6.
- Gao L, Hu J, Zhang X, Wei L, Li S, Miao Z, Chai T. 2015. Application of swine manure on agricultural fields contributes to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* spread in Tai'an, China. *Front Microbiol.* 6:313.
- Gao R, Li Y, Lin J, Tan C, Feng Y. 2016. Unexpected complexity of multidrug resistance in the *mcr-1*-harbouring *Escherichia coli*. *Sci China Life Sci.* 59(7):732-4.
- Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, Vatopoulos A, Gniadkowski M, Toth A, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y. 2010. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill.* 15(46).
- Guber AK, Karns JS, Pachepsky YA, Sadeghi AM, Van Kessel JS, Dao TH. 2007. Comparison of release and transport of manure-borne *Escherichia coli* and enterococci under grass buffer conditions. *Lett Appl Microbiol.* 44(2):161-7.
- Guenter S, Ewers C, Wieler LH. 2011. Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. coli* in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution? *Front Microbiol.* 2:246.
- Guerra B, Fischer J, Helmuth R. 2014. An emerging public health problem: acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Vet Microbiol.* 171(3-4):290-7.
- Haenni M, Métayer V, Gay E, Madec JY. 2016a. Increasing trends in *mcr-1* prevalence among ESBL-producing *E. coli* in French calves despite decreasing exposure to colistin. *Antimicrob Agents Chemother.* 60(10):6433-4.
- Haenni M, Poirel L, Kieffer N, Châtre P, Saras E, Métayer V, Dumoulin R, Nordmann P, Madec JY. 2016b. Co-occurrence of extended spectrum beta lactamase and

- MCR-1 encoding genes on plasmids. *Lancet Infect Dis.* 16(3):281-2.
- Hall BG, Barlow M. 2004. Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. *Drug Resist Updat.* 7(2):111-23.
- Hansen KH, Bortolaia V, Nielsen CA, Nielsen JB, Schønning K, Agersø Y, Guardabassi L. 2016. Host-specific patterns of genetic diversity among Inc11-Iy and IncK plasmids encoding CMY-2 β -lactamase in *Escherichia coli* isolates from humans, poultry meat, poultry, and dogs in Denmark. *Appl Environ Microbiol.* 82:4705–4714.
- Hardy KA, McGowan KL, Fisher MC, Schidlow DV. 1986. *Pseudomonas cepacia* in the hospital setting: lack of transmission between cystic fibrosis patients. *J Pediatr.* 109(1):51-4.
- Hawkey PM. 1998. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ.* 317(7159):657-60.
- Hawkey PM. 2008. Prevalence and clonality of extended-spectrum b-lactamases in Asia. *Clin Microbiol Infect.* 14(Suppl 1):159–165.
- Heuer H, Schmitt H, Smalla K. 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol.* 14(3):236-43.
- Hijazi SM, Fawzi MA, Ali FM, Abd El Galil KH. 2016. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases producing Enterobacteriaceae in healthy children and associated risk factors. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 15:3.
- Huang L, Yao L, He Z, Zhou C, Li G, Yang B, Deng X. 2014. Roxarsone and its metabolites in chicken manure significantly enhance the uptake of As species by vegetables. *Chemosphere.* 100:57-62.
- Hunter PA, Dawson S, French GL, Goossens H, Hawkey PM, Kuijper EJ, Nathwani D, Taylor DJ, Teale CJ, Warren RE, Wilcox MH, Woodford N, Wulf MW, Piddock LJV. 2010. Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. *J Antimicrob Chemother.* 65(Suppl 1):i3-17.
- Jakobsen L, Spangholm DJ, Pedersen K, Jensen LB, Emborg HD, Agersø Y, Aarestrup FM, Hammerum AM, Frimodt-Møller N. 2010. Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. *Int J Food Microbiol.* 142(1-2):264-72.
- Jaurin B, Grundstrom T. 1981. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 78(8):4897-901.
- Johnson AP, Woodford N. 2013. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J Med Microbiol.* 62(Pt 4):499-513.
- Jorgensen CJ, Cavaco LM, Hasman H, Emborg HD, Guardabassi L. 2007. Occurrence of CTX-M-1-producing *Escherichia coli* in pigs treated with ceftiofur. *J Antimicrob Chemother.* 59(5):1040-2.
- Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, Oh MD, Choe KW. 2004. Bloodstream infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(12):4574-81.
- Kang HY, Jeong YS, Oh JY, Tae SH, Choi CH, Moon DC, Lee WK, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC. 2005. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *J Antimicrob Chemother.* 55(5):639-44.

- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2(2):123-40.
- Kiratisin P, Henprasert A. 2011. Resistance phenotype-genotype correlation and molecular epidemiology of *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella* and *Serratia* that carry extended-spectrum beta-lactamases with or without plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 105(1):46-51.
- Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 11(6):315-7.
- Korb AK, Nazareno ER, Costa LD, Nogueira KS, Dalsenter PR, Tuon FFB, Pomba MC. 2015. Tipagem molecular e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli* de frangos de corte e de tratadores na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 35:258-264.
- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 10(9):597-602.
- Lee W, Chung HS, Lee H, Yum JH, Yong D, Jeong SH, Lee K, Chong Y. 2013. CTX-M-55-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Shigella sonnei* isolated from a Korean patient who had travelled to China. *Ann Lab Med.* 33(2):141-4.
- Li A, Yang Y, Miao M, Chavda KD, Mediavilla JR, Xie X, Feng P, Tang YW, Kreiswirth BN, Chen L, Du H. 2016. Complete Sequences of *mcr-1*-Harboring Plasmids from Extended-Spectrum-beta-Lactamase- and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 60(7):4351-4.
- Liebana E, Carattoli A, Coque TM, Hasman H, Magiorakos AP, Mevius D, Peixe L, Poirel L, Schuepbach-Regula G, Torneke K, Torren-Edo J, Torres C, Threlfall J. 2013. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clin Infect Dis.* 56(7):1030-7.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. 2016. 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.* 16(2):161-8.
- Livermore DM. 2012. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med.* 27(2):128-42.
- Lundborg CS, Diwan V, Pathak A, Purohit MR, Shah H, Sharma M, Mahadik VK, Tamhankar AJ. 2015. Protocol: a 'One health' two year follow-up, mixed methods study on antibiotic resistance, focusing children under 5 and their environment in rural India. *BMC Public Health.* 15:1321.
- Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, Perilli M, Stefani S, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. 2006. Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol.* 44(5):1659-64.
- Lytsy B, Sandegren L, Tano E, Torell E, Andersson DI, Melhus A. 2008. The first major

- extended-spectrum beta-lactamase outbreak in Scandinavia was caused by clonal spread of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-15. *APMIS*.116(4):302-8.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 18(3):268-81.
- Malhotra-Kumar S, Xavier BB, Das AJ, Lammens C, Butaye P, Goossens H. 2016. Colistin resistance gene *mcr-1* harboured on a multidrug resistant plasmid. *Lancet Infect Dis*. 16(3):283-4.
- Marchandin H, Carriere C, Sirot D, Pierre HJ, Darbas H. 1999. TEM-24 produced by four different species of Enterobacteriaceae, including *Providencia rettgeri*, in a single patient. *Antimicrob Agents Chemother*. 43(8):2069-73.
- Marshall BM, Levy SB. 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev*. 24(4):718-33.
- Marti R, Scott A, Tien YC, Murray R, Sabourin L, Zhang Y, Topp E. 2013. Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Appl Environ Microbiol*. 79(18):5701-9.
- Martino MD, Koga PC, Pasternak J, Doi AM, Ciola CS, da Silva CB, Massaia IF, da Silva IG, de Araújo MR. 2015. Evaluation of a new rapid test for carbapenemase detection in carbapenem resistant Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods*. 115: 20-1.
- McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC.. 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol*. 41(11):5113-20.
- McGann P, Snesrud E, Maybank R, Corey B, Ong AC, Clifford R, Hinkle M, Whitman T, Lesho E, Schaecher KE. 2016. *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *bla*_{CTX-M} on a Novel IncF Plasmid: First Report of *mcr-1* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 60(7):4420-1.
- Minarini LA, Gales AC, Palazzo IC, Darini AL. 2007. Prevalence of community-occurring extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Brazil. *Curr Microbiol*. 54(5):335-41.
- Minarini LA, Poirel L, Cattoir V, Darini AL, Nordmann P. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 62(3):474-8.
- Minarini LA, Poirel L, Trevisani NA, Darini AL, Nordmann P. 2009. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 65(2):202-6.
- Mohsen SMY, Hamzah HA, Al-Deen MMI, Baharudin R. 2016. Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with Extended-Spectrum beta-lactamase associated Genes in Hospital Tengku Ampuan Afzan, Kuantan, Pahang. *Malays J Med Sci*. 23(2):14-20.
- Monroe S, Polk R. 2000. Antimicrobial use and bacterial resistance. *Curr Opin Microbiol*. 3(5):496-501.
- Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. 2009. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*.

53(1):333-4.

- Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. 2012. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother.* 67(4):906-9.
- Nakayama T, Ueda S, Huong BT, Tuyen le D, Komalamisra C, Kusolsuk T, Hirai I, Yamamoto Y. 2015. Wide dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in community residents in the Indochinese peninsula. *Infect Drug Resist.* 8:1-5.
- Nedjai S, Barguigua A, Djahmi N, Jamali L, Zerouali K, Dekhil M, Timinouni M. 2012. Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamases in Klebsiella-Enterobacter-Serratia group bacteria, in Algeria. *Med Mal Infect.* 42(1):20-9.
- Nguyen NT, Nguyen HM, Nguyen CV, Nguyen TV, Nguyen MT, Thai HQ, Ho MH, Thwaites G, Ngo HT, Baker S, Carrique-Mas J. 2016. Use of Colistin and Other Critical Antimicrobials on Pig and Chicken Farms in Southern Vietnam and Its Association with Resistance in Commensal *Escherichia coli* Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 82(13):3727-35.
- Nogueira KS, Conte D, Maia FV, Dalla-Costa LM. 2015. Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba.* 48(2):162-169.
- Nordmann P, Poirel L. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect.* 8(6):321-31.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 17(10):1791-8.
- Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. 2011. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother.* 66(4):689-92.
- Nordmann P, Dortet L, Poirel L. 2012. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med.* 18(5):263-72.
- Nordmann P, Lienhard R, Kieffer N, Clerc O, Poirel L. 2016. Plasmid-Mediated Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Bacteremia in Switzerland. *Clin Infect Dis.* 62(10):1322-3.
- Nordmann P, Poirel L. 2016. Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace. *Clin Microbiol Infect.* 22(5):398-400.
- Ojdana D, Sacha P, Wieczorek P, Czaban S, Michalska A, Jaworowska J, Jurczak A, Poniatowski B, Trynieszewska E. 2014. 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 Antibiot.* 2014, Article ID 935842.
- Ojo OE, Fabusoro E, Majasan AA, Dipeolu MA. 2016. Antimicrobials in animal production: usage and practices among livestock farmers in Oyo and Kaduna States of Nigeria. *Trop Anim Health Prod.* 48(1):189-97.
- Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH. 1987. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(21):7378-82.
- Overdeest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, Heck M, Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C, van der Zwaluw L, Huijsdens X, Kluytmans J. 2011. Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 17(7):1216-

- 22.
- Ozawa M, Harada K, Kojima A, Asai T, Sameshima T. 2008. Antimicrobial susceptibilities, serogroups, and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *Avian Dis.* 52(3):392-7.
- Patel G, Bonomo RA. 2013. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol.* 4:48.
- Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18(4):657-86.
- Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Liñares J, Ariza J, Gudiol F. 1998. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(1):53-8.
- Pereira PS, de Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. 2013. 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.* 68(2):312-6.
- Pillonetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TP, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. 2014. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(12):7592-4.
- Pitout, JD. 2012. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. *Front Microbiol.* 3:9.
- Poeta P, Antunes T, Rodrigues J. 2005. *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina isolados de fezes de frangos, pombos, gamos e ratos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 57:412-414.
- Poirel L, Bernabeu S, Fortineau N, Podglajen I, Lawrence C, Nordmann P. 2011. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(10):4937-8.
- Poirel L, Berçot B, Millemann Y, Bonnin RA, Pannaux G, Nordmann P. 2012. Carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. in Cattle, France. *Emerg Infect Dis.* 18(3):523-5.
- Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. 2012. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative rods. *Infect Genet Evol.* 12(5):883-93.
- Poirel L, Kieffer N, Liassine N, Thanh D, Nordmann P. 2016. Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis.* 16(3):281.
- Pressman BC. 1965. Induced active transport of ions in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 53(5):1076-83.
- Pressman BC. 1968. Ionophorous antibiotics as models for biological transport. *Fed Proc.* 27(6):1283-8.
- Pressman BC. 1976. Biological applications of ionophores. *Annu Rev Biochem.* 45:501-30.
- Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 20(3):440-58.
- Rapoport M, Faccone D, Pasteran F, Ceriana P, Albornoz E, Petroni A, Corso A. 2016. First Description of *mcr-1*-Mediated Colistin Resistance in Human Infections Caused by *Escherichia coli* in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 60(7):4412-3.
- Reuland EA, Al Naiemi N, Raadsen SA, Savelkoul PH, Kluytmans JA, Vandenbroucke-Grauls CM. 2014. Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw

- vegetables. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33(10):1843-6.
- Rocha FR, Pinto VP, Barbosa FC. 2016. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum beta-Lactamases in Brazil: A Systematic Review. *Microb Drug Resist.* 22(4): 301-11.
- Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, Pérez-Cano R, Pascual A.. 2004. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol.* 42(3):1089-94.
- Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 14(1): 33-41.
- Rozales FP, Ribeiro VB, Magagnin CM, Pagano M, Lutz L, Falci DR, Machado A, Barth AL, Zavascki AP. 2014. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. *Int J Infect Dis.* 25:79-81.
- Ruimy R, Brisabois A, Bernede C, Skurnik D, Barnat S, Arlet G, Momcilovic S, Elbaz S, Moury F, Vibet MA, Courvalin P, Guillemot D, Andremont A. 2010. Organic and conventional fruits and vegetables contain equivalent counts of Gram-negative bacteria expressing resistance to antibacterial agents. *Environ Microbiol.* 12(3):608-15.
- Russell JB, Strobel HJ. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 55(1):1-6.
- Sader HS, Flamm RK, Jones RN. 2014. Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteremia isolates in patients with urinary tract infection: results from United States and European hospitals (2009-2011). *J Chemother.* 26:133-138.
- Sampaio JL, Gales AC. 2016. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on beta-lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol.* 47(1): 31-37.
- Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents.* 17(6):431-7.
- Schwarz S, Johnson AP. 2016. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother.* 71(8):2066-70.
- Sekizuka T, Matsui M, Yamane K, Takeuchi F, Ohnishi M, Hishinuma A, Arakawa Y, Kuroda M. 2011. Complete sequencing of the *bla*(NDM-1)-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. *PLoS One.* 6(9): e25334.
- Silveira GP, Faruk N, Gesser JC, Sá MM Terenzi H. 2006. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Química Nova.* 29(4):844-855.
- Singer RS, Finch R, Wegener HC, Bywater R, Walters J, Lipsitch M. 2003. Antibiotic resistance--the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect Dis.* 3(1):47-51.
- Skov RL, Monnet DL. 2016. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill.* 21(9).
- Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Catry B, Herman L, Haesebrouck F, Butaye P. 2008. Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* Isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(4):1238-43.
- Sun J, Li XP, Yang RS, Fang LX, Huo W, Li SM, Jiang P, Liao XP, Liu YH. 2016. Complete Nucleotide Sequence of an IncI2 Plasmid Coharboring *bla*_{CTX-M-55} and *mcr-1*. *Antimicrob Agents Chemother.* 60(8):5014-7.
- Tacao M, Correia A, Henriques I. 2012. Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of *bla*(CTX-

- M)-like genes. *Appl Environ Microbiol.* 78(12):4134-40.
- Tofteland S, Dahl KH, Aasnæs B, Sundsfjord A, Naseer U. 2012. A nationwide study of mechanisms conferring reduced susceptibility to extended-spectrum cephalosporins in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolates. *Scand J Infect Dis.* 44(12):927-33.
- Toleman MA, Burget JJ, Nizam SA. 2015. Extensively drug-resistant New Delhi metallo-beta-lactamase-encoding bacteria in the environment, Dhaka, Bangladesh, 2012. *Emerg Infect Dis.* 21(6):1027-30.
- Traldi AB, Oliveira MC, Duarte KF, Moraes VMB. 2007. Avaliação de probióticos na dieta de frangos de corte criados em cama nova ou reutilizada. *Revista Brasileira de Zootecnia.* 36:660-665.
- Trott D. 2013. Beta-lactam resistance in gram-negative pathogens isolated from animals. *Curr Pharm Des.* 19(2):239-49.
- Van der Bij AK, Peirano G, Goessens WH, Van der Vorm ER, Van Westreenen M, Pitout JD. 2011. Clinical and molecular characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in the Rotterdam Area, Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(7): 3576-8.
- Venglovsky J, Sasakova N, Placha I. 2009. Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresour Technol.* 100(22):5386-91.
- Verraes C, Van Boxtael S, Van Meervenne E, Van Coillie E, Butaye P, Catry B, de Schaezen MA, Van Huffel X, Imberechts H, Dierick K, Daube G, Saegerman C, De Block J, Dewulf J, Herman L. 2013. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *Int J Environ Res Public Health.* 10(7):2643-69.
- Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. 2011. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis.* 11(5):355-62.
- Wang Y, Wu C, Zhang Q, Qi J, Liu H, Wang Y, He T, Ma L, Lai J, Shen Z, Liu Y, Shen J. 2012. Identification of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 in *Acinetobacter lwoffii* of food animal origin. *PLoS One.* 7(5):e37152.
- Woodford N, Wareham DW, Guerra B, Teale C. 2014. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? *J Antimicrob Chemother.* 69(2):287-91.
- Wright GD. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev.* 57 (10):1451-70.
- Xavier BB, Lammens C, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. 2016a. Complete sequence of an IncFII plasmid harbouring the colistin resistance gene *mcr-1* isolated from Belgian pig farms. *J Antimicrob Chemother.* 71 (8):2342-4.
- Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. 2016b. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* 21(27).
- Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, McDermott P, Walker R, Meng J. 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J Clin Microbiol.* 42 (8):3483-9.
- Yang YQ, Zhang AY, Ma SZ, Kong LH, Li YX, Liu JX, Davis MA, Guo XY, Liu BH, Lei CW, Wang HN. 2016. Co-occurrence of *mcr-1* and ESBL on a single plasmid in *Salmonella enterica*. *J Antimicrob Chemother.* 71(8):2336-8.
- Yao X, Doi Y, Zeng L, Lv L, Liu JH. 2016. Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and MCR-1. *Lancet Infect Dis.* 16(3):288-9.

- Ye H, Li Y, Li Z, Gao R, Zhang H, Wen R, Gao GF, Hu Q, Feng Y. 2016. Diversified *mcr-1*-Harbouring Plasmid Reservoirs Confer Resistance to Colistin in Human Gut Microbiota. *MBio*. 7(2):e00177.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 53(12):5046-54.
- Zakeri A, Kashefi P. 2012. Antimicrobial susceptibilities of avian *Escherichia coli* isolates in Tabriz, Iran. *African Journal of Biotechnology*. 11(19):4467-4470.
- Zhang WJ, Lu Z, Schwarz S, Zhang RM, Wang XM, Si W, Yu S, Chen L, Liu S. 2013. Complete sequence of the bla(NDM-1)-carrying plasmid pNDM-AB from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin. *J Antimicrob Chemother*. 68(7):1681-2.
- Zhi C, Lv L, Yu LF, Doi Y, Liu JH. 2016. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis*. 16(3):292-3.
- Zhou H, Yang Q, Yu YS, Wei ZQ, Li LJ. 2007. Clonal spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* among different cities of China. *J Clin Microbiol*. 45(12):4054-7.
- Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, Hashsham SA, Tiedje JM. 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(9):3435-40.

Livros:

- Barnes HJ, Vaillancourt JP, Gross WB. 2003. Colibacillosis In: SAIF W. M. **Diseases of Poultry**. (11th edition). Iowa State University Press, Ames Iowa, 11^a ed. p.138-144.
- Barth AF, Lutz L, Barros E, Machado A. 2013. Resistência Bacteriana. In: Barros E, Machado A, Sprinz, E. (Ed.). **Antimicrobianos: consulta rápida**. 5^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 556p.
- Bettelheim KA. 1994. Biochemical characteristics of *Escherichia coli*. In: GYLES C. L. **Escherichia coli in Domestic Animals and Humans**. CAB. Wallingford, UK, p. 3-30.
- Farmer JJ, Boatwright KD, Janda JM. 2007. **Enterobacteriaceae: introduction and identification**. In: Murray PR, editor. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington DC: ASM Press; p. 649-669.
- Germano PML, Germano MIS. 2011. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 4. ed. São Barueri: Manole. 1088 p.
- Guardabassi L, Courvalin P. 2006. **Modes of Antimicrobial Action and Mechanisms of Bacterial Resistance**. In (ed): Aarestrup F . *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin: American Society of Microbiology*. p.1-18.
- Guardabassi L, Jensen LB, Kruse H. 2010. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária**. Porto Alegre: Artmed. 267p.
- Jay JM. 2005. **Microbiologia de alimentos**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed. 711 p.
- Madigan MT; Martinko JM; Bender KS; Buckley DH; Stahl DA. 2016. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed.

- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. 2005. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora, 2005. 512p.
- Rice LB, Bonomo RA. 2005. **Genetic and biochemical mechanisms of bacterial**. In Vicol Lorian, M. D. (Eds), Antibiotics in Laboratory Medicine. 5ª ed., p 441:476. Nova Iorque.
- Rice LB, Bonomo RA. 2007. **Mechanism of resistance to antibacterial agents**. In: MURRAY P.R., (Ed.). Manual of Clinical Microbiology. 9ª. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM Press), 2007. p.1114:1145.
- Spinosa HS; Gorniak SL, Bernardi MM. 2011. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 824 p.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2012. **Microbiologia**. Artmed. Porto Alegre. 934p.
- Trabulsi LR, Campos LC. 2002. **Generalidades sobre enterobactérias**. **Microbiologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu. p. 207-213.

Internet:

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2015**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2015>> Acesso em 30 nov. 2016.
- BRASIL. Instrução Normativa SDA/MAPA 65/2006. **Regulamento técnico sobre os procedimentos para a fabricação e o emprego de rações, suplementos, premixes, núcleos ou concentrados com medicamentos para os animais de produção. Aditivos Autorizados**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-autorizados>> Acesso em 15 Out. 2016.
- BRASIL. **Relatório do Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococcus e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. Programa nacional de monitoramento da prevalência e da resistência bacteriana em frango – PREBAF**. ANVISA, 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/relatorios/relatorioprefab.pdf>> Acesso em 15 Out. 2016.
- BRASIL. Nota Técnica nº 01/2013 ANVISA. **Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes**. Abr/2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271858/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+01+de+2013/5be89853-7eca-4b4b-98e4-5096b9f5a2ec>> Acesso em Jul. 2016.
- BRASIL. Instrução Normativa SDA/MAPA 45/2016. **Proibição uso sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal, em todo território nacional**. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=6&data=30/11/2016>> Acesso em 02 Dez. 2016.
- Castro AGM, et al. **Manual Veterinário de Colheita e Envio de Amostras**. Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola (CAPTAA) Instituto Biológico, Descalvado, SP (APTA/SAA-SP). 2010. Organização Pan Americana de Saúde (OPAS). Disponível em: <<http://ww3.panaftosa.org.br/Comp/MAPA/ManuaisTecnicos/Colheita/SerManTec13.pdf>> Acesso em 8 abr. 2015.

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **About One Health**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/onehealth/about.html>>. Acesso em 8 abr. 2015.
- CLSI, **Performance standards for antimicrobial susceptibility**. Twenty-second Information Supplement. CLSI document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA; 2015.
- CLSI, **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically**, Approved Standard, 10th ed., CLSI document M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2015.
- ECL - **Laboratory for *Escherichia coli* (ECL)**. Université de Montréal. 1981. França. Disponível em: <<http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/index.asp>> Acesso em 12 Jul. 2016.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. Version 6.0. EUCAST; 2016. Disponível em: <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0/Breakpoint_table.pdf> Acesso em 03 Fev. 2016
- European Food Safety Authority (EFSA), BIOHAZ Panel, 2013. **Scientific Opinion on Carbapenem resistance in food animal ecosystems**. EFSA J. 11, 3501, 70. Disponível em <<http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/3501.pdf>> Acesso em 8 abr. 2015.
- European Medicines Agency (EMA). **Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 25 EU/EEA countries in 2011. Tird ESVAC Report**. European Medicines Agency, 2013 Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2013/10/WC500152311.pdf> Acesso em 10 dez. 2013.
- European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority and European Medicines Agency, ECDC/EFSA/EMA. 2015. **First joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals**. 114p. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2015.4006/epdf>> Acesso em 12 Jul. 2016.
- FDA. (U.S. Food and Drug Administration). **Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals**. 2010.
- Lentz SAM, Morales DL, Cuppertino VML, Motta AS, Barth AL, Martins AF. 2016. **First Report of *E. coli* Isolates Harboring the *mcr-1* Gene in Brazil**. In: ASM Microbe 2016. Abstract LB-110. Boston, USA: 2016: p. 3924. Disponível em: <<http://asmmicrobe.org/images/AbstractsUpdated.pdf>> Acesso em 30 Jun. 2016.
- Pereira PS, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef APD. 2014. **First description of NDM-1- producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil**. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, P1196, Poster Session V, Worldwide spread of carbapenem resistance. 2014. Disponível em: <http://2014.eccmid.org/fileadmin/eccmid/2014/media/images/PDF_Documents/912199_ECCMID2014_LR24.pdf> Acesso em 30 Nov 2015.
- UE – União Europeia. Jornal Oficial da União Europeia. **Regulamento (CE) n° 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2003 relativo aos aditivos destinados à alimentação animal**. 2003. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0029:0043:pt:PDF>> Acesso em 02 Abr. 2016.

- US Food and Drug Administration (US-FDA). 2012. **Cephalosporin order of prohibition goes into effect.** Disponível em: http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/_ucm299054.htm Acesso em 30 Nov. 2016.
- WHO. World health statistics 2012. 2012. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44844/1/9789241564441_eng.pdf Acesso em 23 Dez. 2015.
- WHO. World Health Organization. Antimicrobial resistance Draft global action plan on antimicrobial resistance. Disponível em: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_20-en.pdf?ua=1 Acesso em 23 Dez. 2015.

ANEXO A – Artigo publicado.

LETTER

Letter to the editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil

SA Lentz^{1,2}, D de Lima-Morales^{2,3}, VM Cuppertino¹, Lds Nunes³, AS da Motta¹, AP Zavascki⁴, AL Barth³, AF Martins^{1,3}

1. ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS - Univ. Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

2. These authors contributed equally to this work.

3. LABRESIS – Lab. de Pesquisa em Resistência Bacteriana, HCPA - Hosp. de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

4. Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence: Afonso Luis Barth (albarth@hcpa.edu.br)

Citation style for this article:

Lentz SA, de Lima-Morales D, Cuppertino VM, Nunes Lds, da Motta AS, Zavascki AP, Barth AL, Martins AF. Letter to the editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. Euro Surveill. 2016;21(26):pii=30267. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30267>

Article submitted on 21 June 2016 / accepted on 30 June 2016 / published on 30 June 2016

To the editor: The recent paper by Fernandes et al. [1] described the presence of the *mcr-1* gene in *Escherichia coli* from pigs and poultry in Brazil. The authors stated that microbiology laboratories worldwide should be aware of *mcr-1* isolates resistant to polymyxins in patients living in or returning from Latin American countries and highlighted that the *mcr-1* gene dissemination results from polymyxins' misuse as growth promoter in food animals. In view of the concerning spread of antibiotic resistance, we screened *E. coli* isolates obtained from a poultry slaughterhouse in southern Brazil with official reports on antibiotic use.

Poultry rectal swabs were collected between August and October 2015. A total of 340 chickens farmed in Brazil and belonging to 17 batches were included in the study. All poultry had received bacitracin, narasin and ncarbazine during a first period of life (between the 2nd and the 18th day) and avilamycin and salinomycin during a second period (between the 20th and 35th day); the chickens of batches 10 and 11 had also received doxycycline during at total of 3 days, in the second period of life. Poultry included in this study were not exposed to polymyxin during their entire life (around 40 days).

A total of 343 isolates were evaluated by polymerase chain reaction (PCR) for the *mcr-1* gene [2] and 10 (3%) were positive. The *mcr-1* gene was confirmed by sequencing the PCR amplicon. The *mcr-1* positive isolates were obtained from 10 different chickens belonging to three batches from three different breeders. The polymyxin B minimum inhibitory concentrations (MIC) of the 10 *mcr-1* positive isolates were 2 mg/L (8 isolates), 1 mg/L and 0.25 mg/L and they could be classified as susceptible to polymyxin B, according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility

Testing (EUCAST) (resistance > 2 mg/L). In contrast, most reports indicate that the *mcr-1* gene is usually found in isolates presenting resistance to polymyxins [2-6].

The *mcr-1* positive isolates were submitted to DNA macrorestriction typing by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and five isolates, from the same batch, proved to be clonally related while the other five isolates were unrelated. Conjugation experiments with the *E. coli* J53 were successful for two *mcr-1* positive isolates which confirmed that the *mcr-1* gene was located in a plasmid. The transconjugants presented positive results by PCR for the *mcr-1* gene and had a polymyxin B MIC of 2 mg/L.

According to Brazilian law, all slaughterhouses must submit in advance to the Federal Inspection Service of the Ministry of Agriculture, the bulletin of health of each batch of animals to be slaughtered. It is of note that the chickens evaluated in this study have received antibiotics as growth promoters, but polymyxins were not included among these compounds. This goes against the hypothesis that the emergence of the *mcr-1* gene is linked to the use of polymyxins in animal feed in Brazilian livestock [1] and suggests that others compounds or factors may also be involved in the selection of this gene.

Finally, the fact that the *mcr-1* was originally described in China and thereafter in several other countries including Europe indicates that this gene is already widespread in the world. Therefore, isolates with *mcr-1* should be considered in any patient, regardless of whether they were living in or returning from Latin America or not.

*Authors' correction

On 3 August, the Acknowledgements section was modified to include Laurent Poirel and acknowledge his provision of an mcr-1 positive control.

Acknowledgements

The authors would like to thank Amanda Silva Martins and Zelia Fonseca Vieira for the technical support and Laurent Poirel for providing an mcr-1 positive control*. This study was funded by CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and FIPE – Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Conflict of interest

None declared.

Authors' contributions

Conceived the project: AFM; Managed sample collection: SAML, ASM, AFM; Performed laboratory investigations: SAML, DLM, LSN, VMLC; Drafted the article: DLM; Revised the article: APZ, ALB, AFM.

References

1. Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, 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.* 2016;21(17):30214. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214 PMID: 27168587
2. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, 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.* 2016;16(2):161-8. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7 PMID: 26603172
3. Elnahriry SS, Khalifa HO, Soliman AM, Ahmed AM, Hussein AM, Shimamoto T, et al. Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-1 in a Clinical *Escherichia coli* Isolate from Egypt. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(5):3249-50. DOI: 10.1128/AAC.00269-16 PMID: 26953204
4. Malhotra-Kumar S, Xavier BB, Das AJ, Lammens C, Hoang HT, Pham NT, et al. Colistin-resistant *Escherichia coli* harbouring mcr-1 isolated from food animals in Hanoi, Vietnam. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(3):286-7. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)00014-1 PMID: 26774248
5. Rapoport M, Faccione D, Pasteran F, Ceriana P, Albornoz E, Petroni A, et al. First description of mcr-1-mediated colistin resistance in human infections caused by *Escherichia coli* in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(7):4412-3. DOI: 10.1128/AAC.00573-16 PMID: 27090181
6. Ye H, Li Y, Li Z, Gao R, Zhang H, Wen R, et al. Diversified mcr-1-Harboring Plasmid Reservoirs Confer Resistance to Colistin in Human Gut Microbiota. *MBio.* 2016;7(2):e00177-16. DOI: 10.1128/mBio.00177-16 PMID: 27048797

License and copyright

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) Licence. You may share and adapt the material, but must give appropriate credit to the source, provide a link to the licence, and indicate if changes were made.

This article is copyright of the authors, 2016.

ANEXO B – Boletim Sanitário.

ANEXO - BOLETIM SANITÁRIO

Nome da Granja de Origem das Aves:					
Produtor:					
Responsável Técnico (emissor de GTA):					
Nº cadastro órgão estadual defesa:					
Georreferenciamento:					
Município:			UF:		
Carga de pintos de 1 dia recebidas ⁽¹⁾	Nº GTA pintos de 1 dia	Data da emissão da GTA no incubatório	Total de pintos de 1 dia declarados na GTA	Data do recebimento dos pintos de 1 dia na granja	Total de pintos Recebidos na granja
Carga de aves para abate ⁽¹⁾	Nº GTA	Data da emissão	Data do carregamento	Total de aves declaradas para o abate na GTA	% de mortalidade na emissão da GTA ⁽²⁾
Número de aves remanescente no lote ⁽³⁾					
Número de aves remanescente no lote ⁽³⁾					
% Mortalidade após finalização do lote ⁽⁴⁾					%
Doenças detectadas no lote:					
Drogas administradas no lote ⁽⁵⁾					
Princípio Ativo	Início	Fim		Vacinação para DNC	
				<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
Data e hora da retirada da alimentação					
Informações adicionais (declarações adicionais no verso – respaldo para certificação sanitária) ⁽⁶⁾					
Carimbo e Assinatura do emissor da GTA					
USO DO SERVIÇO OFICIAL					
AÇÕES FISCAIS			Observações		
Mortalidade > 10% não notificada ao serviço de defesa sanitária animal	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Nº formulário:		
Apresentação de sinais clínicos	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Nº formulário:		
Coleta realizada pelo SIF	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Nº formulário:		
Outras Observações no verso					
Carimbo e Assinatura do FFA					

- (1) Para utilização no caso de mais de uma carga por lote, transportadas em datas diferentes. (por ex: 1ª carga, 2ª carga etc...) Poderão ser incluídas mais linhas quando houverem mais de duas cargas;
- (2) Informar a porcentagem de aves mortas até a data de emissão do GTA (Nº de aves vivas X 100/nº de aves alojadas);
- (3) Nº de aves que permaneceram na granja após a carga parcial;
- (4) % de mortalidade na emissão de GTA + Mortalidade entre a emissão da GTA e a chegada das aves no frigorífico;
- (5) Incluir drogas terapêuticas e não terapêuticas como os melhoradores de desempenho e outros;
- (6) Respaldos para atendimento de mercado específicos (por ex: administração de ração vegetal, credenciamento de granjas para declaração de ordem sanitárias e etc...).

ANEXO C – Carta de aprovação da Comissão de ética no Uso de Animais.



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 29445

Título: PREVALENCIA DE CARBAPENEMASES EM ISOLADOS DE E. COLI PROVENIENTES DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO

Vigência: 01/10/2015 à 01/02/2017

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ANDREZA FRANCISCO MARTINS - coordenador desde 01/10/2015
AFONSO LUIS BARTH - pesquisador desde 01/10/2015
AMANDA DE SOUZA DA MOTTA - pesquisador desde 01/10/2015
VICTÓRIA MARTINS LIMA CUPERTINO - Assistente de Pesquisa desde 01/10/2015
SILVIA ADRIANA MAYER LENTZ - Aluno de Mestrado desde 01/10/2015

Equipe Externa:

Paula Marques Rivas - Médico Veterinário desde 01/10/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 05/10/2015 - Sala 323 - Anexo I do Prédio da Reitoria - Campus Centro da UFRGS- Bairro Farroupilha - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 298 aves de produção, sem idade definida, ambos os sexos, provenientes de abatedouros frigoríficos de aves existentes no Rio Grande do Sul, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 26 de Outubro de 2015

Cristiane Matte

CRISTIANE MATTE
Coordenador da comissão de ética