



UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – UDESC OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DISSEMINAÇÃO AMBIENTAL EM PROPRIEDADES
SUINÍCOLAS DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS
UTILIZANDO A *Escherichia coli* COMO BIOMARCADORA**

MAIARA CRISTIANE BRISOLA

CHAPECÓ, 2018

MAIARA CRISTIANE BRISOLA

**DISSEMINAÇÃO AMBIENTAL EM PROPRIEDADES SUINÍCOLAS DA
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS UTILIZANDO A *Escherichia coli* COMO
BIOMARCADORA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**.

Orientadora: Prof. PhD. Lenita Moura Stefani
Co-orientador: Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva

Chapecó, SC, Brasil
2018

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC

Brisola, Maiara Cristiane
DISSEMINAÇÃO AMBIENTAL EM PROPRIEDADES
SUINÍCOLAS DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS
UTILIZANDO A *Escherichia coli* COMO BIOMARCADORA /
Maiara Cristiane Brisola. - Chapecó , 2018.
67 p.

Orientadora: Lenita Moura Stefani
Co-orientador: Aleksandro Schafer da Silva
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado
de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do
Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,
Chapecó, 2018.

1. Ambiente. 2. Contaminação fecal. 3. ESBLs. 4.
Fluoroquinolonas. 5. Resistência. I. Moura Stefani,
Lenita . II. Schafer da Silva, Aleksandro. , .III.
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de
Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia. IV. Título.

**Universidade do Estado de Santa Catarina
UDESC Oeste
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DISSEMINAÇÃO AMBIENTAL EM PROPRIEDADES SUINÍCOLAS DA
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS UTILIZANDO A *Escherichia coli* COMO
BIOMARCADORA**

Elaborada por
Maiara Cristiane Brisola

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

Comissão Examinadora:



Prof. PhD. Lenita Moura-Stefani – UDESC
Universidade do Estado de Santa Catarina



Prof. Dra. Lillian Kolling Girardini – UNOESC
Universidade do Oeste de Santa Catarina



Prof. Dr. Diovani Paiano – UDESC
Universidade do Estado de Santa Catarina

Chapecó, 06 de fevereiro de 2018.

“Eis o meu segredo: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos. Os homens esqueceram essa verdade, mas tu não a deves esquecer. Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”

Antoine de Saint-Exupéry em O Pequeno Príncipe

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo simples fato de viver. Afinal, o que seria do homem sem a pura bondade do senhor em lhe dar o dom da vida.

Aos meus pais Luiz Roberto Brisola e Tereza Pecini Brisola por me ensinar o valor da vida, do esforço e da fé, e por terem me apoiado nesta caminhada e incentivado a nunca desistir. A minha irmã Rubia Mara Brisola por estarmos juntas nos momentos mais felizes e também nos mais difíceis de nossas vidas.

Ao meu amado namorado Eduardo Machado que em todos os momentos esteve ao meu lado, com muito amor e compreensão me apoiando nas mais difíceis escolhas, pelo consolo nos momentos difíceis e pelas inúmeras alegrias que sinto ao estar ao seu lado. Quero dizer simplesmente: te amo.

A Universidade do Estado de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade da realização de um sonho.

A professora PhD. Lenita Moura Stefani que me ensinou sobre a importância do caráter e do comprometimento e pela orientação do mestrado de maneira enriquecedora, muito obrigada.

Agradeço à CAPES e a FAPESC pelo apoio financeiro concedido.

A equipe LABMIM, pelo auxílio durante o meu experimento, na coleta de amostras e pelo apoio nos momentos importantes desta caminhada.

A minhas colegas do mestrado Jéssica Giuriatti e Regiane Crecencio pelos momentos de alegria e companherismo, saibam que quero que nossa amizade vá além das barreiras acadêmicas, e sim para a vida.

A todas as pessoas, que direta ou indiretamente torceram por mim e contribuíram para a realização desta pesquisa.

Muito obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

DISSEMINAÇÃO AMBIENTAL EM PROPRIEDADES SUINÍCOLAS DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS UTILIZANDO A *Escherichia coli* COMO BIOMARCADORA

AUTORA: Maiara Cristiane Brisola

ORIENTADORA: Prof. PhD. Lenita Moura Stefani

Chapecó, 6 de fevereiro de 2018.

O objetivo deste estudo foi verificar a disseminação ambiental de cepas de *Escherichia coli* em propriedades suinícolas do Oeste de Santa Catarina e utilizá-la como biomarcadora para avaliar o perfil fenotípico da susceptibilidade aos antimicrobianos, a possível presença de ESBLs (Beta-Lactamases de Espectro Estendido) e genes responsáveis pela resistência às fluoroquinolonas. Foram utilizadas para o isolamento de *E. coli* o total de 306 amostras, sendo 103 amostras de fezes suínas, 105 de água e 98 de solo oriundas de propriedades suinícolas dos municípios com maior produção de suínos do oeste catarinense. Os isolados de *E. coli* foram submetidos ao antibiograma com os antimicrobianos: amoxicilina associada ao ácido clavulânico (20/10 µg), ceftiofur (30 µg), enrofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), sulfametoxazol associado ao trimetoprim (1,25/23,75 µg) e colistina (10 µg). Os isolados também foram submetidos ao teste de disco aproximação indicador da produção de ESBLs e pesquisa via PCR dos genes *bla*CTY-M2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1, responsáveis pela produção de ESBLs e dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* que conferem resistência às quinolonas e fluoroquinolonas. O percentual de isolamento de *E. coli* encontrado para as amostras de fezes, água e solo foi de 66,02%, 30,48% e 35,71% respectivamente. Os maiores percentuais de resistência obtidos foram para os antimicrobianos sulfametoxazol associado ao trimetoprim (63,70%), colistina (45,19%) e enrofloxacina (39,26%). Quanto aos níveis de multirresistência foi possível observar que 37,04% dos isolados eram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos. Dos perfis de multirresistência avaliados, o perfil A (GEM-SUT-ENO-COL) foi o mais comumente encontrado (16%). Detectamos valores de IRMA (Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos) acima de 0,2 em 78% das amostras multirresistentes. Dos 135 isolados foi possível detectar cepas produtoras de ESBLs (7,41%), onde destas, 60% apresentaram positividade para o gene *bla*TEM-1, 50% para o gene *bla*CMY-M2 e 90% para os genes *qnrS*. Das cepas resistentes à enrofloxacina não produtoras de ESBLs apresentaram positividade para o gene *qnrS* e *qnrB*, 17,39% e 2,17%, respectivamente e o gene *qnrA* não foi detectado. Os resultados obtidos neste estudo, utilizando a *E. coli* como biomarcadora, demonstraram a contaminação de amostras ambientais por microrganismos de origem fecal, além, dos altos índices de resistência, presença de genes produtores de beta-lactamases e de resistência a fluoroquinolonas, reforçando ainda mais a necessidade do uso consciente dos antimicrobianos e também do tratamento adequado de dejetos e efluentes.

Palavras-chave: Ambiente, contaminação fecal, ESBLs, fluoroquinolonas, resistência.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Animal Science Graduate Program
University of Santa Catarina State

ENVIRONMENTAL DISSEMINATION IN SWINE PROPERTIES OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE USING *Escherichia coli* AS A BIOMARKER

AUTHOR: Maiara Cristiane Brisola
ADVISOR: Prof. PhD. Lenita Moura Stefani
Chapecó, February 6th, 2018

The objective of this study was to verify the environmental dissemination of strains of *Escherichia coli* in pig farms in the West of Santa Catarina state and to use it as a biomarker to evaluate the phenotypic profile of antimicrobial susceptibility, the possible presence of ESBLs (Extended Spectrum Beta-Lactamases) and genes responsible for quinolone resistance. A total of 306 samples were used for the isolation of *E. coli*, of which 103 samples were from swine feces, 105 of water and 98 of soil from pig farms of few municipalities with the largest production of pigs from the west of Santa Catarina. The isolates of *E. coli* were submitted to antimicrobial antibiotics: amoxicillin associated with clavulanic acid (20/10 µg), ceftiofur (30 µg), enrofloxacin (5 µg), gentamicin (10 g), trimethoprim sulfamethoxazole (1.25/ 23.75 µg) and colistin (10 µg). The isolates were also submitted to the ESBL-test approximation and the PCR test of the genes *bla*CTY-M2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1, responsible for the production of ESBLs and the *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* genes that confer resistance to quinolones and fluoroquinolones. The percentage of *E. coli* isolates found for feces, water and soil samples was 66.02%, 30.48% and 35.71%, respectively. The highest percentages of resistance were obtained for antimicrobial agents sulfamethoxazole associated with trimethoprim (63.70%), colistin (45.19%) and enrofloxacin (39.26%). Regarding the multiresistance levels, it was possible to observe that 37.04% of the isolates were resistant to three or more classes of antimicrobials. Out of all multiresistant profiles evaluated, profile A (GEM-SUT-ENO-COL) was the most commonly found (16%). We detected values of IRMA (Multiple Resistance Index to Antimicrobials) above 0.2 in 78% of the multiresistant strains. Out of 135 isolates, it was possible to detect ESBLs producers (7.41%), of which 60% showed positivity for *bla*TEM-1 gene, 50% for the *bla*CMY-M2 gene and 90% for the *qnrS* genes. Of the non-ESBL-producing enrofloxacin-resistant strains, the *qnrS* and *qnrB* genes, 17.39% and 2.17%, respectively were positives, and the *qnrA* gene was not detected. The results obtained in this study, using *E. coli* as a biomarker, demonstrated the contamination of environmental samples by fecal microorganisms, in addition to high resistance indexes, the presence of beta-lactamase genes and resistance to fluoroquinolones, reinforcing the need for a more conscious use of the antimicrobials and also for proper treatment of animal waste.

Keywords: Environment, fecal contamination, ESBLs, fluoroquinolones, resistance.

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I	10
REVISÃO DE LITERATURA.....	10
1.1 SUINOCULTURA E MEIO AMBIENTE	10
1.1.1 A bactéria <i>E. coli</i>	11
1.1.2 <i>E. coli</i> como biomarcadora das condições ambientais	13
1.2 ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA BACTERIANA	15
1.2.1 Elementos genéticos móveis e integrons	17
1.2.2 Resistência bacteriana aos aminoglicosídeos, sulfonamidas e polimixinas	18
1.2.3 Resistência bacteriana aos beta-lactâmicos	21
1.2.4 Resistência bacteriana às fluoroquinolonas	24
1.3 OBJETIVOS	26
1.3.1 Objetivo Geral	26
1.3.2 Objetivos Específicos	26
2. CAPÍTULO II.....	27
2.1 MANUSCRITO.....	28
<i>Escherichia coli</i> utilizada como biomarcadora de resistência antimicrobiana isolada de fazendas suínas no Sul do Brasil	28
1. Introdução.....	31
2. Materiais e métodos.....	32
3. Resultados.....	37
4. Discussão	45
5. Conclusão	50
7. Referências do manuscrito.....	51
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	58

1. CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 SUINOCULTURA E MEIO AMBIENTE

O Brasil no ano de 2017 foi o quarto no ranking mundial de produção de carne suína, com 3,3 milhões de toneladas produzidas anualmente e deste total, 600 mil toneladas foram exportadas para mais de 70 países (ABPA, 2017). No ano de 2017, o estado de Santa Catarina foi responsável por 38% da exportação de toda a carne suína brasileira, onde os principais destinos foram países como a Rússia, China e Hong Kong. A região oeste de Santa Catarina produziu 73,2% da carne suína do estado, o que gerou cerca de 60 mil empregos diretos em indústrias de beneficiamento, com mais de 18 mil produtores integrados a agroindústrias, além de produtores independentes (CIDASC, 2017).

O desenvolvimento da suinocultura de Santa Catarina resulta em expressivos ganhos de produtividade e eficiência técnica, mas a concentração da produção em menor área geográfica para obter ganhos em grande escala e eficiência logística, pode contribuir para problemas ambientais, pois, o volume de dejetos produzidos ultrapassa a capacidade de assimilação do ambiente (EMBRAPA, 2009). A alta concentração da produção pode acarretar problemas como a saturação do solo ocasionada pelos dejetos dos animais e, conseqüentemente, a contaminação dos cursos hídricos. Uma preocupação relacionada ao processo de produção intensiva de suínos é a quantidade de dejetos gerados nas granjas, assim, como o potencial poluente e a carga bacteriana que esses ocasionam (EPAGRI, 2014).

A principal destinação para o dejetos suíno é a sua aplicação como fertilizante agrícola do solo, mas sem o adequado manejo causa poluição ambiental, pois, pode poluir os recursos hídricos, provocando a eutrofização e alterando a biodiversidade da água, além da contaminação com o excesso de nutrientes e microrganismos fecais causadores de doenças em humanos e animais e carreadores de genes de resistência aos antimicrobianos (SILVA et al., 2015).

Os materiais orgânicos e inorgânicos podem ser carreados pelo escoamento das chuvas para mananciais hídricos e o solo, podendo aumentar substancialmente a carga de poluentes nestes locais, e além de modificar as características físicas, químicas e biológicas do solo

trazendo riscos à população e à saúde pública (NEILL, 2018). Sabe-se que a qualidade da água está diretamente relacionada com inúmeras enfermidades e diferentes microrganismos, entre eles a *Escherichia coli* que pode ser utilizada como bioindicadora das condições do ambiente, pois, é uma bactéria comumente encontrada no trato gastrointestinal dos animais de sangue quente e desta forma o correto manejo de dejetos torna-se fundamental para evitar a contaminação do meio ambiente, onde a aplicação dos resíduos deve ser de forma regulada, utilizando-se de critérios como as propriedades do solo e avaliações ecotoxicológicas (MACCARI et al., 2016).

1.1.1 A bactéria *E. coli*

A *E. coli* é uma bactéria pertencente a família *Enterobacteriaceae*, bacilo Gram-negativo que possui a membrana externa composta de lipopolissacarídeos, não formadora de esporos, móvel ou imóvel e com metabolismo respiratório facultativo (QUINN et al., 2005). Constituem um grupo de bactérias que normalmente habitam a microbiota intestinal do homem e dos animais, e na maioria das vezes, não patogênicas. Entretanto, subgrupos de *E. coli* apresentam fatores de virulência que os tornam capazes de causar doenças, como as *E. coli* produtoras de toxinas Shiga (STEC), por exemplo, formando um grupo de bactérias patogênicas envolvidas em surtos de doenças transmitidas por alimentos (CALDORIN et al., 2013).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as doenças de origem alimentar são aquelas causadas pela ingestão de alimentos ou de água contaminados e podem ser de natureza infecciosa, quando provocadas por microrganismos ou tóxicas quando provocadas por toxinas químicas (WHO, 2002). Entre os diferentes tipos de *E. coli* que provocam diarreia, as STEC possuem um lugar de destaque, já que estão relacionadas a um grande espectro de doenças humanas, que podem variar de diarreia leve até severa diarreia sanguinolenta (colites hemorrágicas - CH) que podem evoluir para complicações extraintestinais graves como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), cuja mais grave possível sequela é a falência renal e a Púrpura Trombocitopênica (PTT), que atinge principalmente idosos (MORA et al., 2005).

A *E. coli* é classificada com base em diferenças antigênicas (sorotipagem) e fatores de virulência. Dois componentes da superfície da bactéria formam a base primária para o sistema de classificação sorológico: o antígeno O (lipopolissacarídeos ou LPS) e os flagelos H, onde o antígeno O identifica o sorogrupo de uma estirpe e a combinação antígeno O e H identificam o

seu sorotipo, como por exemplo a *E. coli* O157:H7 e a *E. coli* O157:H19 (MENG, 2001). Com base nos sintomas das doenças, nas características sorológicas e fatores de virulência, os subgrupos de *E. coli* correlacionados a infecções intestinais são classificados em seis patotipos, sendo eles: *E. coli* Enteropatogênica (EPEC); *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* de Adesão Difusa (DAEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000).

Para Caldorin et al. (2013), a bactéria pode ser excretada pelas fezes e pode contaminar águas de superfícies ou subterrâneas, assim como hortaliças, solo e produtos de origem animal. A *E. coli* O157:H7 pode ser transmitida pelo contato direto com animais infectados e seres humanos, por meio da transmissão fecal-oral e contaminação cruzada no preparo de alimentos. Foi detectada pela primeira vez em bovinos, e pode ser transmitida das fezes dos animais para água, vegetais e alimentos de origem animal como leite, carne e seus derivados (NESPOLO et al., 2014).

Na produção avícola, cepas de *E. coli* relacionadas a enfermidades são denominadas APEC e são consideradas um importante agente infeccioso, pois, causam inúmeros prejuízos econômicos. A colibacilose aviária é uma infecção extraintestinal que atinge galinhas, perus e patos, mas podem contaminar gansos, pássaros domésticos e selvagens (OLIVEIRA, 2011). A dispersão bacteriana é facilitada por alguns fatores ambientais, tais como processos de desinfecção inadequados, alta temperatura do ambiente e densidade populacional, além de ventilação ineficiente e elevadas concentrações de gases que levam à destruição do epitélio da traqueia o que favoreceu a colonização do trato respiratório pelo microrganismo (CAMARGO; SUFFREDINI, 2015).

Para a suinocultura, a *E. coli* é um dos principais patógenos que causam impactos negativos à produção e possui capacidade de desenvolver resistência. Os leitões são os animais mais susceptíveis diante da falta de barreira gástrica e baixa imunidade, principalmente no período neonatal e no pós desmame (SILVA et al., 2015). . A colibacilose é uma enfermidade entérica de grande impacto na suinocultura. Para o desenvolvimento da enfermidade é necessária a adesão das bactérias à mucosa intestinal e a produção de uma ou mais enterotoxinas (termolábeis e termoestáveis) que levam ao desenvolvimento de diarreia e desidratação, o que pode resultar na morte dos animais (BERTSCHINGER; FAIRBROTHER, 1999). Devido a grande ocorrência dessas doenças na suinocultura, assim como em outras produções, a utilização

de antimicrobianos para a prevenção de enfermidades é amplamente difundida e a *E. coli* é caracterizada pela alta resitência a antimicrobianos, trazendo problemas como a disseminação de genes de resistência a múltiplos antimicrobianos para o ambiente e, conseqüentemente, para humanos e animais (SILVA et al., 2015).

1.1.2 *E. coli* como biomarcadora das condições ambientais

Por ser uma bactéria de origem fecal, a *E. coli* pode indicar contaminação ambiental e é amplamente utilizada para indicar a qualidade da água, no qual a sua contagem estima o grau de poluição fecal (SOUZA, 2010). Quando o material fecal é transferido para águas superficiais ou para o solo, pode ocorrer a disseminação de agentes patogênicos, facilitando a ocorrência de doenças gastrointestinais em seres humanos e nos animais (FEWTRELL; KAY, 2015).

Além da contaminação ambiental ocasionada pela *E. coli*, os alimentos de origem animal podem apresentar contaminação por este microrganismo, ocasionando intoxicação alimentar em humanos que os consumirem. Estes alimentos podem estar contaminados com microrganismos provenientes da manipulação inadequada, por condições precárias de higiene nas propriedades rurais e nas indústrias, a partir de pessoas ou animais doentes, durante a manipulação e o processamento de alimentos, da água contaminada e longos períodos de armazenamento em temperatura que possibilite o crescimento microbiano (ALVES; PINHEIRO, 2007).

Em áreas rurais, a possibilidade de contaminação fecal no ambiente é elevada, pois, a falta de infra-estrutura para tratamento de esgoto, associado aos altos índices de produção animal, podem representar importantes fontes de contaminação, principalmente com uso de dejetos animais não tratados para adubação de áreas de pastagem e lavouras (NEILL, 2018).

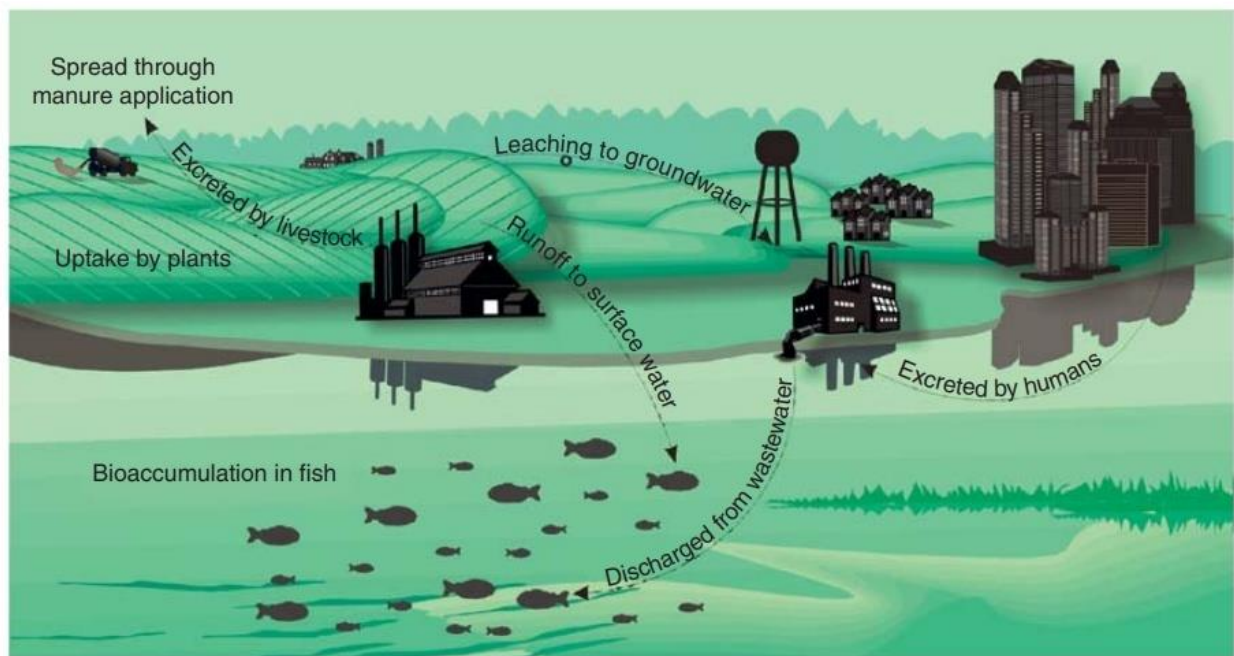
De acordo com Schroeder et al. (2002), ao entrar em contato com a *E. coli*, seja por meio de solo e água contaminada ou através de alimentos, os humanos e animais podem apresentar ou não enfermidades, isso vai depender do seu estado imunológico e o grau de patogenicidade do microrganismo, sendo que, para o tratamento e prevenção de doenças infecciosas de origem bacteriana, são utilizados antimicrobianos que desempenham importante papel na saúde humana e animal.

A introdução de resíduos de antimicrobianos e de cepas resistentes a estes princípios ativos pode ocorrer de diversas formas no meio ambiente, como ilustra a Figura 1. Os

antimicrobianos de uso humano e veterinário podem ser introduzidos no solo por meio dos dejetos dos animais ou da falta de tratamento e destinação correta do esgoto humano e através do escoamento superficial e lixiviação de cepas resistente aos antimicrobianos, que podem ser transportadas para fontes de água superficiais e subterrâneas (MOJICA; AGA, 2011).

Os resíduos de antimicrobianos também podem ser introduzidos no ambiente pela aplicação direta na agricultura e aquicultura, deficiência no tratamento de efluentes de hospitais, indústrias farmacêuticas e agroindústrias e através do uso inadequado de sanitizantes e desinfetantes utilizados na higienização e limpeza de ambientes, pois, estudos recentes demonstram a relação entre o uso destes princípios ativos e a resistência a antimicrobianos (CHRISTOU et al., 2017).

Figura 1. Fontes e transporte de antimicrobianos humanos e veterinários na obra artística ambiental de Christine Klein.



Fonte: MOJICA, E. R.; AGA, D. S. Antibiotics Pollution in Soil and Water: Potential Ecological and Human Health Issues. **Encyclopedia of Environmental Health**, p. 97, 2011.

Até meados dos anos 90, acreditava-se que a *E. coli* não era capaz de sobreviver por longos períodos de tempo fora do trato intestinal do hospedeiro, mas estudos recentes mostram o contrário, sendo capaz de se reproduzir no solo, areia e sedimentos em diferentes tipos de clima

(ROCHELLE-NEWALL et al., 2015), e o seu crescimento e sobrevivência nestes ambientes depende de fatores bióticos, como a presença de outros microrganismos e a capacidade da *E. coli* em adquirir nutrientes, competir com outros microrganismos, formar biofilmes em ambientes naturais e ainda fatores abióticos como temperatura, água, disponibilidade de nutrientes, pH e radiação solar (JANG et al., 2017).

A grande distribuição ambiental da *E. coli* agrava os problemas com a disseminação de genes de resistência, pois, é uma das principais bactérias onde elementos genéticos móveis como plasmídeos estão sendo detectados e desta forma, a utilização de antimicrobianos como aditivos alimentares na produção animal representam uma importante fonte de seleção de microrganismos resistentes (SILVA et al., 2015).

1.2 ANTIMICROBIANOS E RESISTÊNCIA BACTERIANA

Os agentes antimicrobianos além de serem utilizados como terapêuticos na medicina humana e veterinária, são usados para a prevenção de doenças e ainda como melhoradores de desempenho na produção animal. Estas ações podem ocasionar a seleção de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, o que pode trazer ameaças à saúde pública (SCHROEDER et al., 2002). Desta forma, o uso de antimicrobianos vem recebendo crescente atenção e com isso a União Européia restringiu completamente o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no ano de 2006. No entanto, esta proibição implicou no aumento do uso de antimicrobianos com finalidade terapêutica e que pode contribuir no desenvolvimento da resistência bacteriana em animais e humanos (BURROW, 2014).

Recentemente a Organização Mundial de Saúde, destacou os riscos causados a saúde pública pela resistência à importantes antimicrobianos de espectro estendido, como cefalosporinas, fluoroquinolonas e carbapenemos (WHO, 2014). Isso se deve à diminuição da eficácia de antibióticos utilizados no tratamento de infecções comuns ter se acelerado nos últimos anos (LAXMINARAYAN et al., 2013). Estima-se que cerca de 25.000 pessoas morrem a cada ano na Europa, a partir de infecções por bactérias resistentes a antimicrobianos (LAMBERT et al., 2011). Nos EUA, 19.000 mortes foram associadas com infecções invasivas ocasionadas por MRSA (*Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina) (KLEVENS et al., 2007). De acordo com Woodford et al. (2014), as preocupações são aumentadas quando a resistência ocorre em animais

de produção, onde o potencial risco de transmissão aos seres humanos pela cadeia alimentar e meio ambiente é maior.

Para designar agentes ou classes de antimicrobianos de importância crítica para a medicina humana deve-se utilizar os seguintes critérios: ser a única terapia ou alternativa para tratar doenças humanas, serem agentes antimicrobianos utilizados para tratar doenças causadas por microrganismos que podem ser transmitidos por animais e humanos ou doenças causadas por organismos que possam adquirir genes de resistência (WHO, 2007). A microbiota intestinal dos animais de produção pode ser uma fonte de infecção para os seres humanos, principalmente de patógenos entéricos com *E. coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, entre outros (SINGER et al., 2003).

Apesar da maioria das cepas de *E. coli* serem consideradas comensais do trato gastrointestinal de humanos e animais, as cepas patogênicas podem causar diferentes infecções intestinais e extraintestinais por serem facilmente encontradas no meio ambiente e em alimentos (SHIN et al., 2015). Para combater as doenças causadas por *E. coli* são utilizados antibióticos que muitas vezes já não possuem ação efetiva sobre esta bactéria, pois a mesma pode estar carregando em seu material genético genes de resistência (SCHROEDER et al., 2002).

A resistência bacteriana aos antibióticos pode ser de forma natural, quando há ausência de um processo metabólico alvo do antimicrobiano ou ainda adquirida que ocorre a partir de mutações genéticas e da pressão seletiva microbiana ocasionada pela vantagem competitiva de cepas resistentes à determinados antimicrobianos, onde os genes de resistência podem estar situados no cromossomo bacteriano, bem como em elementos extracromossômicos transmissíveis como os plasmídeos (LAXMINARAYAN et al., 2013).

Existem diferentes mecanismos que possibilitam que as bactérias tornem-se resistentes aos antimicrobianos, sendo eles: a) modificações na permeabilidade da parede celular bacteriana, que dificulta o acesso dos antimicrobianos; b) bomba de efluxo, onde através do transporte ativo o antimicrobiano é bombeado para fora da bactéria; c) modificação da partícula do antimicrobiano através de ação enzimática; d) degradação do agente antimicrobiano; e) utilização de vias metabólicas diferentes às afetadas pelo antimicrobiano; f) modificação do sítio alvo do antimicrobiano (TENOVER, 2006).

Para a *E. coli*, as cefalosporinas de terceira e quarta geração, quinolonas e aminoglicosídeos são considerados agentes antimicrobianos com importância crítica e a

resistência pode comprometer a eficácia destes agentes que são comumente utilizados para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas como a *E. coli* dentre outras (HAMMERU; HEUER, 2009). Particularmente, a resistência às cefalosporinas de terceira e quarta geração é prevalente e mediada por beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), o que traz sérios problemas para a medicina humana e animal (HAMMERU; HEUER, 2009). Existem diversos mecanismos de transferência da resistência bacteriana através de elementos genéticos móveis, capazes de disseminar genes de resistência entre microrganismos da mesma espécie e também entre espécies diferentes (MARTÍNEZ et al., 2016).

1.2.1 Elementos genéticos móveis e integrons

Para facilitar a transmissão de genes que codificam resistência aos antimicrobianos, as bactérias possuem elementos genéticos móveis, também chamados de elementos transponíveis, onde inicialmente na década de 1970, muitos casos de multirresistência foram associados com plasmídeos transmissíveis (STOKES; HALL, 1989). Os plasmídeos são moléculas circulares duplas de DNA capazes de se replicar independentemente dos cromossomos, cujo tamanho pode variar entre dezenas a milhares de kilobases (MARTÍNEZ et al., 2016). Podem ser passados de uma bactéria para outra por transferência horizontal de genes, proporcionando uma vantagem seletiva, como a resistência aos antibióticos (CARATTOLI, 2013), conferindo resistência para as principais classes de agentes antimicrobianos, incluindo beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim, macrolídeos e fluoroquinolonas (CARATTOLI, 2009).

Além dos plasmídeos, os transposons também possuem a habilidade de se mover dentro do genoma bacteriano, onde a transposição de genes para diferentes sítios do genoma é considerada uma das principais formas de rearranjo do DNA bacteriano, podendo modificar a expressão desses genes (BENNETT, 2008). Devido ao crescente aumento na resistência bacteriana aos antimicrobianos, diversos elementos móveis foram descobertos, como por exemplo, os já citados plasmídeos e transposons, mas estudos comparativos destes componentes resultaram na descoberta dos integrons (ROWE-MAGNUS; MAZEL, 2002).

Os integrons são elementos genéticos considerados sistemas naturais de clonagem, capazes de incorporar ORFs (quadros de leitura abertos) por recombinação de sítio específico e

convertê-los em genes funcionais (cassetes gênicos), garantindo a expressão correta (MAZEL, 2006). Cinco classes de integrons móveis são conhecidas por ter importância na disseminação de genes de resistência entre bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, incluindo a *E. coli*, onde os integrons da classe 1 (gene *int1*) tem sido mais estudados. Estes são os mais prevalentes em isolados clínicos, onde a sua região conservada possui dois genes, o *qacED1* que confere resistência aos desinfetantes a base de âmonia quaternária e *sul1* que é responsável pela resistência a sulfonamida (MAZEL, 2006).

O aumento da incidência de resistência aos antimicrobianos vem sendo destacado, principalmente devido a sua relação com a presença de integrons em *E. coli* comensal oriundas de adultos de crianças saudáveis de diversos países (CARATTOLI, 2013).

1.2.2 Resistência bacteriana aos aminoglicosídeos, sulfonamidas e polimixinas

Da classe dos aminoglicosídeos, o primeiro antibiótico utilizado foi a estreptomicina, obtido a partir do fungo *Streptomyces griseus* no ano de 1944. Desta classe, as principais drogas atualmente utilizadas são a gentamicina, tobramicina, ampicamicina, netilmicina, paramomicina e espectinomicina (ANVISA, 2007). O alcance dessa classe de antimicrobianos é relativamente restrito, sendo utilizados para tratar infecções ocasionadas por bactérias Gram-negativas como *Acinetobacter* spp, *Enterobacter* spp, *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp e *Serratia* spp e podem ser administrados em associação com outros antimicrobianos para tratar infecções ocasionadas por bactérias Gram-positivas como por exemplo o *S. aureus* (EDMUNDS; MAYHEW, 2009).

Os aminoglicosídeos agem interrompendo a síntese de proteínas através da ligação a subunidade ribossomal 30S, impedindo a leitura correta do RNA mensageiro e consequentemente, prejudicando a síntese protéica (BRUCE; HICKS, 2011). Cepas da família *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram-negativos como *Pseudomonas* spp e *Acinetobacter* spp possuem altos índices de resistência aos aminoglicosídeos (YANG et al., 2011) por três mecanismos gerais de resistência: (1) diminuição da concentração intracelular do antimicrobiano dentro da bactéria, geralmente através do efluxo do fármaco para fora da bactéria; (2) alteração do alvo molecular do antimicrobiano, geralmente como resultado de uma mutação no gene que codifica o alvo ou substituição da função do alvo através de um gene exógeno e (3) inativação

enzimática do aminoglicosídeo (JANA; DEB, 2006). As bactérias resistentes possuem como principal mecanismo a produção de enzimas de modificação dos aminoglicosídeos, tais como acetil-transferases, nucleotidiltransferases e fosfotransferases, enzimas estas que podem inativar aminoglicosídeos comumente usados, como gentamicina e tobramicina (YANG et al., 2011). As enzimas acetil-transferases (AACs) são capazes de catalizar a acetilação de uma região seletiva dos grupos amino do aminoglicosídeo, onde, essa enzima reduz a afinidade do local de ligação 30S do ribossomo (JANA; DEB, 2006). A AAC (3) é uma das maiores famílias de acetil-transferases e inclui quatro tipos principais denominadas de I a IV com base no padrão de resistência que conferem (DRAKER; WRIGHT, 2004).

A primeira enzima capaz de modificar a estrutura de um aminoglicosídeo a ser purificada foi uma acetil-transferase R-plasmidial em *E. coli*, que era responsável pela resistência a gentamicina, permitindo assim, as primeiras pesquisas sobre a especificidade do substrato dessas enzimas (HEGDE et al., 2001). Altas taxas de resistência a gentamicina já foram detectadas em *E. coli* isoladas da microbiota de frangos de corte, onde esse antimicrobiano é utilizado como promotor de crescimento, indicando que o trato gastrointestinal das aves poderia ser um reservatório de genes de resistência de importantes antimicrobianos (PESSANHA; FILHO, 2001).

A sulfacrisoidina, da classe das sulfonamidas, foi em 1935 o primeiro agente antimicrobiano utilizado clinicamente, marcando o início da era moderna da quimioterapia antimicrobiana. As sulfonamidas possuem efeito bacteriostático e inibem o metabolismo do ácido fólico pela bactéria por um mecanismo competitivo, onde as células dependem do metabolismo endógeno, diferentemente de células humanas, que conseguem aproveitar o folato exógeno (ANVISA, 2007). Algumas sulfonamidas, como o sulfametoxazol é comumente empregado em associação com o trimetoprim, uma diaminopirimidina, associação chamada de cotrimoxazol e o efeito do sinergismo das duas drogas é atuar em passos diferentes da síntese do ácido fólico, necessário para a síntese dos ácidos nucléicos bacterianos, onde o sulfametoxazol inibe um passo intermediário da reação e o trimetoprim a formação do metabólito ativo do ácido no final do processo (ANVISA, 2007).

O cotrimoxazol foi introduzido e usado amplamente no Reino Unido em 1969, tornando-se um dos principais antimicrobianos utilizados para tratamento em infecções do trato urinário. Mas a partir de 1995, o uso do cotrimoxazol foi restringido, já que a resistência bacteriana à

sulfonamidas em isolados clínicos de *E. coli* estava em taxas elevadas (BEAN et al., 2005). Em todo o mundo são comuns altas taxas de resistência a sulfonamidas em bactérias Gram-negativas em animais e humanos e, ao contrário do que acontece com outras classes de antimicrobianos, apenas três genes que codificam a resistência a sulfonamidas foram identificados (*sul1*, *sul2* e *sul3*) (WU et al., 2010). Em agentes da família *Enterobacteriaceae* os genes *sul1* e *sul2* são os mais frequentes, onde os genes *sul1* fazem parte dos segmentos dos integrons classe 1, principais integrons detectados nessas bactérias. Além disso, esses genes podem ser transferidos entre bactérias através de integrons, transposons ou plasmídeos (HAMMERUM et al., 2006). O uso do sulfametoxazol associado ao trimetoprim é proibido pela legislação brasileira como promotor de crescimento, aditivo alimentar ou conservante de alimentos devido as altas taxas de resistência identificadas já consolidadas que podem estar associadas ao uso indiscriminado deste antimicrobiano no período anterior ao veto (CARDOSO et al., 2015).

Já as polimixinas são um grupo de antimicrobianos ativos contra diversas bactérias Gram-negativas. Produzidas por cepas de *Bacillus polimyxa* as quais foram descritas primeiramente em 1947 por pesquisadores norte-americanos e ingleses, onde o nome polimixina é derivado do microrganismo de origem e constituem um grupo formado por polimixinas A, B, C, D e E, sendo esta última chamada de colistina (MENDES; BURDMANN, 2009). Atuam na membrana externa e citoplasmática das bactérias, são antimicrobianos anfipáticos e possuem ação parecida com a dos detergentes catiônicos. Se ligam a componentes da membrana celular como fosfolipídeos e lipopolisacarídeos, deslocando por competição íons de Ca e Mg que atuam como estabilizadores da membrana, provocando a ruptura da mesma, levando a bactéria a morte (STORM et al., 1977).

A colistina é uma polimixina com estrutura polipeptídica muito usada como promotor de crescimento em produções de aves e suínos, com espectro de ação preferencialmente sobre bacilos Gram-negativos como *E. coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp e *Pseudomonas aeruginosa* (SPINOSA, 2006). O uso da colistina é uma opção de tratamento para casos de cepas multirresistentes, como a *Pseudomonas aeruginosa*, que podem ser resistentes a antimicrobianos aminoglicosídeos e beta-lactâmicos. Altas taxas de resistência a colistina mediada por plasmídeos foram detectadas em *E. coli* de alimentos de origem animal na China, onde o potencial de disseminação do gene *mcr-1* poderia levar a falhas no uso da colistina em ambientes clínicos e consequentemente, a morbidade e mortalidade (LIU et al., 2015).

Na América do Sul, de acordo com Fernandes et al. (2016), a resistência a colistina foi investigada em enterobactérias isoladas de humanos, animais, alimentos e ambiente e encontrou-se cepas de *E. coli* positivas para o gene *mcr-1*. Cepas de *E. coli mcr-1* positivas foram isoladas de alimentos de origem animal produzidos no sul do Brasil, nos estados de Santa Catarina e Paraná e estão associadas a produção de ESBLs do tipo CTX, agravando o quadro da resistência bacteriana (FERNANDES et al., 2016). Este antimicrobiano já foi amplamente utilizado como melhorador de desempenho, entretanto, a recente detecção dos genes que conferem resistência e a sua importância crítica à saúde humana, a utilização do sulfato de colistina como aditivo zootécnico melhorador de desempenho na formulação de rações para aves, bovinos e suínos foi proibida no Brasil de acordo com a Instrução Normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016 (BRASIL, 2016).

1.2.3 Resistência bacteriana aos beta-lactâmicos

Os antimicrobianos beta-lactâmicos são agentes que constituem a primeira classe de produtos naturais utilizados no tratamento de infecções bacterianas, pois inibem a enzima transpeptidase, que catalisa a reação de transpeptidação entre as cadeias de peptidoglicano da parede da célula bacteriana. Este grupo de antimicrobianos engloba as penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactâmicos e alguns inibidores de beta-lactamases e são amplamente utilizados pela sua eficácia terapêutica e baixa toxicidade (BAPTISTA, 2013).

De acordo com Pupo et al. (2006), pela natureza mais complexa da parede celular das bactérias Gram-negativas, os antimicrobianos beta-lactâmicos são pouco capazes de atravessar a barreira lipídica da célula bacteriana. Antes mesmo da penicilina, primeiro antibiótico beta-lactâmico a ser lançado comercialmente, houve o surgimento da resistência bacteriana através de enzimas que hidrolisavam o anel beta-lactâmico do antimicrobiano, essencial para a eficácia do fármaco, onde a primeira beta-lactamase a ser identificada foi em *E. coli* (ABRAHAM; CHAIN, 1940). Segundo Bradford (2001), a rápida resistência a beta-lactâmicos principalmente em *S. aureus* é devido a uma penicilinase mediada por plasmídeos que se espalhou rapidamente em outras espécies bacterianas.

A produção de enzimas beta-lactamases que são capazes de promover a hidrólise do anel beta-lactâmico é o principal mecanismo de resistência de Gram-negativas a esses

antimicrobianos. A resistência as cefalosporinas de terceira geração é geralmente mediada pela produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e plasmídeos ou integrons (KONG; SCHNEPER; MATHEE, 2010). São capazes de inativar quase todos os antimicrobianos beta-lactâmicos com exceção apenas das cefamicinas e dos carbapenêmicos (imipenem, meropenem) e podem ser inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (HARADA; ISHII; YAMAGUCHI, 2008).

Enterobactérias produtoras de ESBLs são de grande importância à saúde pública, uma vez que estas bactérias possuem susceptibilidade reduzida a estes antimicrobianos que são amplamente utilizados em medicina humana e veterinária (VAN DAMME et al., 2017) e que são frequentemente isoladas de alimentos de origem animal, inclusive da carne suína (VON SALVIATI et al., 2014). Considerados como importantes portadores de bactérias produtoras de ESBLs, os animais de produção podem contribuir para a disseminação desses microrganismos para os seres humanos através de diferentes rotas, como o contato direto com os animais ou também pela contaminação ambiental (DOHMEN et al., 2015).

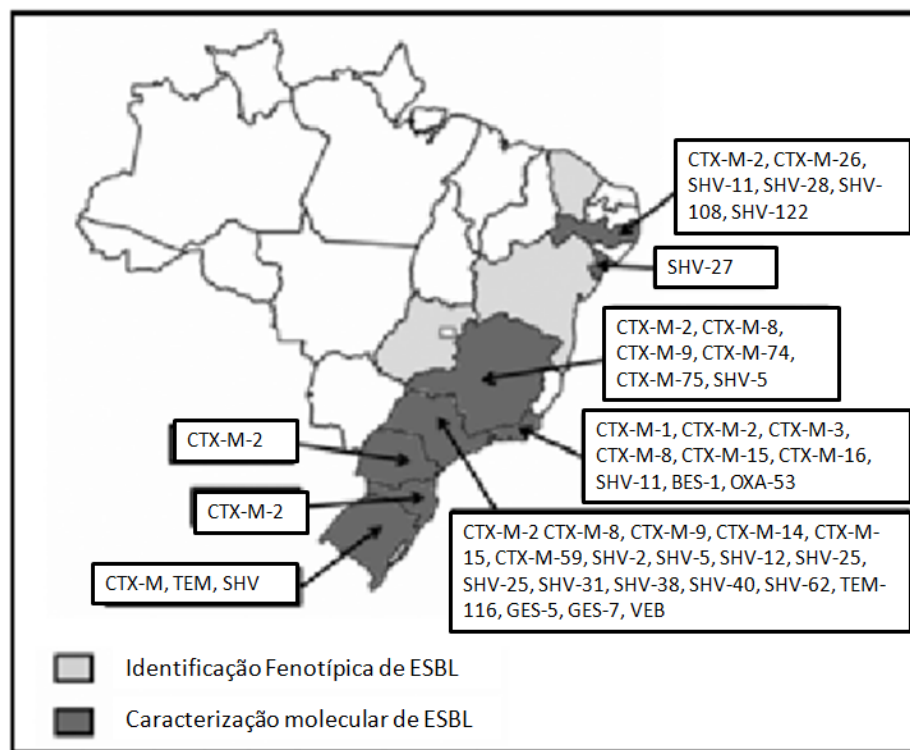
As ESBLs de acordo com a sua homologia de sequência de aminoácidos podem ser classificadas em diferentes grupos (HARADA; ISHII; YAMAGUCHI, 2008). Atualmente, quatro classes são conhecidas (A, B, C e D) e são correlacionadas com suas classificações funcionais. As classes A, C e D agem através do mecanismo baseado em “Serine-Beta-Lactamases”, enquanto a classe B ou “Metallo-beta-lactamases” necessitam de Zinco (Zn) para sua ação. A maioria das ESBLs estão contidas na classe molecular “A” de Ambler (AMBLER, 1980).

A primeira beta-lactamase mediada por plasmídeo encontrada em bactérias gram-negativas foi a TEM-1, descrita no início dos anos 1960, encontrada em uma cepa de *E. coli* isolada em uma cultura sanguínea de uma paciente chamada Temoniera (TEM) na Grécia e por ser mediada por plasmídeos e transposons é de fácil propagação para outras espécies bacterianas (BRADFORD, 2001). As enzimas dos genes *bla*TEM, *bla*SHV e *bla*CTX-M são consideradas as mais prevalentes na última década, mas enzimas *bla*CTX-M se espalham rapidamente entre as enterobactérias tornando-se cada vez mais prevalentes em certas áreas do planeta (XU et al., 2011). Alguns genes são mutantes de beta-lactamases mediadas por plasmídeos estabelecidos, como o *bla*TEM e *bla*SHV e outros são mobilizados a partir de bactérias do ambiente como o *bla*CTX-M, onde nos Estados Unidos da América, o gene de resistência mais prevalente é o

*bla*CTX-M-15 que está associado a estirpe de *E. coli* S:25b-ST131 amplamente distribuída no país (OVERDEVEST et al., 2011).

Sobre a produção de ESBLs em enterobactérias no Brasil, já foram detectados genes do tipo TEM, SHV, CTX-M, OXA, entre outros, onde podemos visualizar na Figura 02. Enzimas pertencentes à família CTX-M são consideradas as mais prevalentes na América do Sul, assim como na Espanha e no Leste Europeu (SILVA; LINCOPAN, 2012).

Figura 2. Distribuição de ESBLs em *Enterobacteriaceae* no Brasil.



Fonte: SILVA, K. C. da; LINCOPAN, N. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: clinical impact and implications for agribusiness. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, p. 91-99, 2012.

Outro grupo de beta-lactamases que exhibe perfil hidrolítico importante é o *AmpC*, que possui atividade hidrolítica adicional às cefamicinas. A inibição de *AmpCs* geralmente pode ser feita por ácido borônico e cloxacilina, mas não pelos inibidores comumente utilizados, como o ácido clavulânico e o tazobactam (BAJAJ et al., 2016). No entanto, a aquisição e a disseminação de genes de *AmpC* mediados por plasmídeos, mesmo em menor grau, representam uma séria

preocupação de saúde pública para o futuro próximo. Entre as *AmpC* beta-lactamases, o gene *blaCMY-2* é o mais prevalente em diversas bactérias Gram-negativas e fatores como elementos conjugativos integrativos, ilhas genômicas, sequências de inserção e vetores como plasmídeos têm sido envolvidos na disseminação desses genes (FANG et al., 2015).

Enzimas do tipo *blaOXA-1* são carbapenemases da classe das metalo-beta-lactamases e possuem diversificado potencial hidrolítico, conferindo resistência a antimicrobianos carbapenems utilizados como importantes alternativas ao tratamento de infecções graves (POIREL et al., 2016)

Tem sido observado que cepas bacterianas produtoras de ESBLs também possuem susceptibilidade diferenciada para outros antimicrobianos, como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim associado ao sulfametoxazol, dentre outros, sendo um fator importante, pois estes fármacos são alternativos no tratamento de infecções causadas por cepas de *E. coli* produtoras de ESBLs (BAJAJ et al., 2016).

1.2.4 Resistência bacteriana às fluoroquinolonas

Os antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas são de amplo espectro e abrangem uma série de bactérias Gram-negativas, sendo também eficazes contra uma variedade de microrganismos Gram-positivos como *Streptococcus* spp e *Staphylococcus* spp (WOLFSON; HOOPER, 1989). As fluoroquinolonas diferem das quinolonas pela adição de um átomo de flúor na sexta posição, o que lhe confere maior ação antimicrobiana e maior espectro de ação (REDGRAVE et al., 2014). É um antimicrobiano sintético e sua ação está baseada em inibir duas enzimas envolvidas na síntese de DNA bacteriano, a DNA girase e a Topoisomerase IV que são responsáveis pela separação das fitas dupla hélice e não são produzidas pelas células animais e humanas, mas são essenciais para a replicação do DNA bacteriano, permitindo que esse agente seja específico às células bacterianas (BLONDEAU, 2004).

A primeira fluoroquinolona utilizada clinicamente foi o ácido nalidíxico, lançado para o tratamento de infecções urinárias em 1962. Posteriormente, novos fármacos passaram a ser desenvolvidos a partir dos agentes anteriores e com potência aumentada, maior espectro e menor resistência bacteriana (WOLFSON; HOOPER, 1989).

Foram descritos três principais mecanismos de resistência às fluoroquinolonas, sendo eles: alterações nas enzimas alvo, mutações cromossômicas que alteram a expressão ou a função das porinas reduzindo a permeabilidade às fluoroquinolonas em espécies Gram-negativas (REDGRAVE et al., 2014) e aquisição de plasmídeos contendo genes de resistência em bactérias que abrigam resistência transferível mediada por plasmídeo de resistência a quinolona como a proteína *qnr* que se liga a Topoisomerase, impedindo fisicamente a ligação das fluoroquinolonas com a enzima alvo, levando à resistência a droga (KAO et al., 2016).

Na última década, estes genes tornaram-se cada vez mais frequentes em membros da família *Enterobacteriaceae*, onde cepas de *E. coli* produtoras de ESBLs também mostraram alta resistência a ciprofloxacina e a enrofloxacin (KAO et al., 2016). Já foram identificadas mais de 100 variantes do gene *qnr* e estas estão agrupadas em cinco famílias distintas: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS* (MOUMONI et al., 2017). O primeiro gene mediado por plasmídeo foi detectado em 1998 e denominado *qnrA* (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; PASCUAL; JACOBY; 1998). Os genes do tipo *qnr* são conhecidos por fornecer baixos níveis de resistência às quinolonas e fluoroquinolonas, entretanto, podem facilitar a seleção de resistência de níveis maiores e levar a falhas no tratamento (JACOBY; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2014). Os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* são considerados os mais prevalentes em enterobactérias provenientes de suínos, além de *Aac* (6')-Ib-cr, *QepA* e *OqxAB* que possuem capacidade de extrusão de quinolonas mas com prevalência ainda reduzida (CHEN et al., 2012).

De acordo com Jacoby; Strahilevitz & Hooper (2014), estudos realizados na última década relatam que a frequência de detecção de genes *qnr* está aumentando em *E. coli*, mas os resultados demonstram ainda baixa prevalência, sendo inferior a 10% em isolados não selecionados para produção de ESBLs. Porém, quando as cepas são pré-selecionadas para ESBLs ou outros fenótipos de resistência, a prevalência de genes *qnr* pode chegar a 39%, demonstrando a correlação entre produção de ESBLs e resistência a fluoroquinolonas.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Verificar a disseminação ambiental de cepas de *E. coli* resistentes a antimicrobianos em propriedades suínolas do Oeste de Santa Catarina e utilizá-la como biomarcadora para avaliar o perfil fenotípico da susceptibilidade a antimicrobianos, e genotípico com a possível presença de ESBLs e genes responsáveis pela resistência às fluoroquinolonas.

1.3.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a prevalência da bactéria *E. coli* em amostras de fezes suínas, água e solo oriundas de propriedades suínolas;
- b) Verificar o perfil fenotípico de resistência e multirresistência das cepas de *E. coli* provenientes das amostras coletadas;
- c) Comparar o percentual de resistência das cepas de *E. coli* entre os diferentes tipos de amostras e classes de antimicrobianos;
- d) Verificar fenotipicamente a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) nas cepas de *E. coli* isoladas;
- e) Detectar genes que conferem a produção de ESBLs;
- f) Detectar a presença de genes *qnr* responsáveis pela resistência às fluoroquinolonas;
- g) Relacionar a coexistência entre cepas portadoras de genes ESBLs e *qnr*.
- h) Criar uma bacterioteca de cepas de *E. coli* de origem suínola para estudos futuros.

2. CAPÍTULO II

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de manuscrito com formatação de acordo com as orientações da revista ao qual será submetido: Science of the Total Environment.

2.1 MANUSCRITO

***Escherichia coli* utilizada como biomarcadora de resistência antimicrobiana isolada
de fazendas suínas no Sul do Brasil**

Maiara Cristiane Brisola, Regiane Boaretto Crecencio, Káren Bés, Dinael Simão Bitner, Angélica Frigo, Luana Rampazzo, Lenita Moura Stefani, Gláucia Amorim Faria

De acordo com normas para publicação em:

Science of the Total Environment

***Escherichia coli* utilizada como biomarcadora de resistência antimicrobiana isolada de fazendas suínas no Sul do Brasil**

Maiara Cristiane Brisola^{1,4}, Regiane Boaretto Crecencio^{1,4}, Káren Bés^{1,4}, Dinael Simão Bitner^{2,4},
 Angélica Frigo^{2,4}, Luana Rampazzo^{2,4}, Lenita Moura Stefani^{3,4}, Gláucia Amorim Faria⁵

¹Acadêmica do Curso de Mestrado em Zootecnia, UDESC-Oeste.

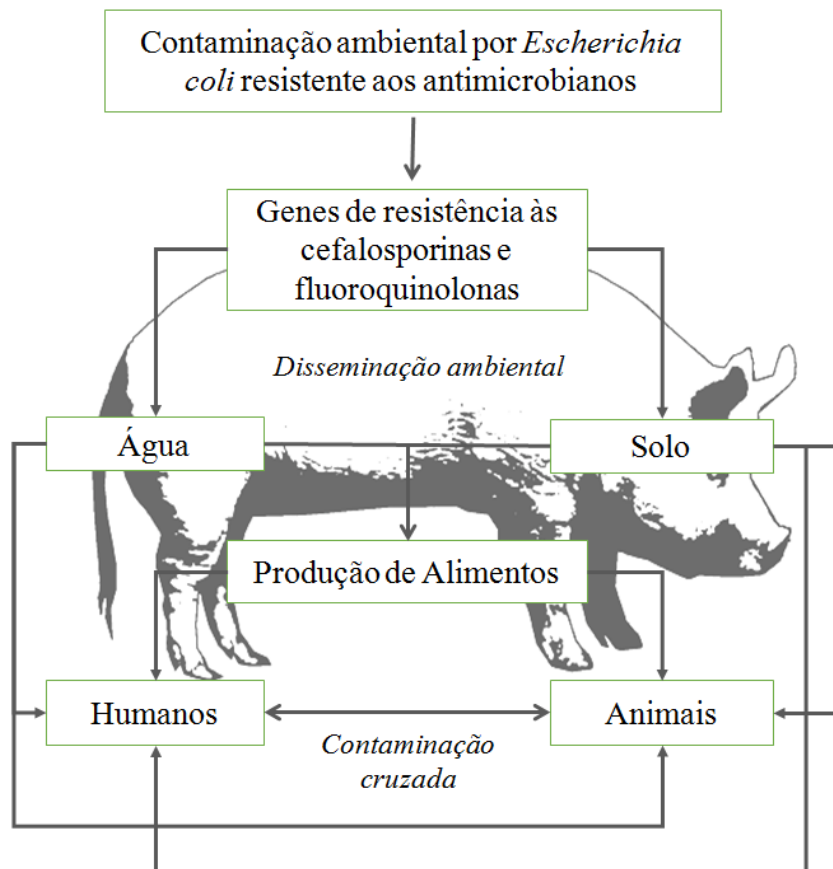
²Acadêmico(a) do Curso de Zootecnia, UDESC-Oeste.

³Orientadora, Departamento de Zootecnia, UDESC-Oeste

⁴Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC-Oeste, Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Chapecó, SC, Brasil.

⁵Professora de Estatística e Experimentação da FEIS-UNESP. Ilha Solteira, Brasil.

Resumo Gráfico



1 **Destaques**

2

- 3 • Prevalência da bactéria *E. coli* em amostras de fezes suínas, água e solo nas propriedades
- 4 suínícolas no sul do Brasil.
- 5 • Perfil fenotípico de resistência e multirresistência das cepas de *E. coli* à cinco classes de
- 6 antimicrobianos.
- 7 • Produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs).
- 8 • Co-existência dos genes de ESBLs e *qnr* em isolados fenotipicamente produtores de
- 9 ESBLs.

10

11 **Resumo**

12

13 O objetivo deste estudo foi verificar a presença de cepas de *Escherichia coli* resistentes aos
 14 antimicrobianos em propriedades suínícolas e utilizá-la como biomarcadora para avaliar o perfil
 15 fenotípico e genotípico da susceptibilidade aos antimicrobianos, a presença de Beta-lactamases
 16 de Espectro Estendido (ESBLs) e de genes responsáveis pela resistência às fluoroquinolonas.
 17 Foram utilizadas para o isolamento de *E. coli*, 306 amostras (103 amostras de fezes suínas, 105
 18 de água e 98 de solo) oriundas dos principais municípios produtores de suínos da região Oeste de
 19 Santa Catarina. Os isolados foram submetidos aos testes de disco-difusão, ao teste de disco-
 20 aproximação para a observação da produção de ESBLs e a pesquisa via PCR dos genes *bla*CTY-
 21 M2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1, responsáveis pela produção de
 22 ESBLs e dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* que conferem resistência a quinolonas e fluoroquinolonas.
 23 O percentual de isolamento de *E. coli* encontrado para as amostras de fezes, água e solo foram de
 24 66,02%, 30,48% e 35,71% respectivamente. Os maiores percentuais de resistência obtidos foram
 25 para os antimicrobianos sulfametoxazol associado ao trimetoprim (63,70%), colistina (45,19%) e
 26 enrofloxacina (39,26%). Quanto aos níveis de multirresistência 37,04% dos isolados eram
 27 resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos. Foram também observados os principais
 28 perfis de multirresistência, onde o perfil A (GEM-SUT-ENO-COL) com 16% das amostras
 29 multirresistentes foi o mais prevalente. Detectamos valores de Índice de Resistência Múltipla aos
 30 Antimicrobianos (IRMA) acima de 0,2 em 78% das amostras multirresistentes. Dos 135 isolados,
 31 foi possível detectar 10 (7,41%) cepas produtoras de ESBLs destas, 60% apresentaram

1 positividade para o gene *bla*TEM-1, 50% para o gene *bla*CMY-M2 e 90% para o gene *qnrS*. Das
2 cepas resistentes à enrofloxacinina não produtoras de ESBLs apresentaram positividade para os
3 genes *qnrS* e *qnrB*, 17,39% e 2,17% respectivamente e o gene *qnrA* não foi detectado. Os
4 resultados obtidos neste estudo, utilizando a *E. coli* como biomarcadora, demonstraram a
5 presença de microrganismos de origem fecal nos isolados de origem ambiental (solo e água),
6 além, dos altos índices de resistência a diversos antimicrobianos e genes produtores de beta-
7 lactamases e de resistência às fluoroquinolonas em isolados provenientes de fezes e de origem
8 ambiental.

9 **Palavras-chave:** Contaminação fecal, *Escherichia coli*, ESBLs, quinolonas, resistência.

11 1. Introdução

13 O Brasil é um dos maiores produtores de proteína animal do planeta e no ano de 2017
14 produziu 3,3 milhões de toneladas de carne suína, onde destas, 600 mil toneladas foram
15 exportadas para mais de 70 países (ABPA, 2017). No ano de 2016, o estado de Santa Catarina foi
16 responsável por 38% da exportação de toda a carne suína brasileira (EPAGRI, 2017). Porém, esta
17 alta concentração da produção animal pode acarretar problemas como a saturação do solo
18 ocasionada pelos dejetos e também a contaminação dos cursos hídricos, sendo preocupações
19 relacionadas ao processo de produção intensiva de suínos (SILVA et al., 2015).

20 Quando o material fecal é transferido para águas superficiais ou para o solo pode ocorrer a
21 disseminação de agentes patogênicos e um microrganismo comumente utilizado como
22 biomarcador de contaminação ambiental é a *Escherichia coli*. Esta bactéria tem origem fecal por
23 ser comensal do trato gastrointestinal dos animais e do homem, podendo ser patogênica e
24 disseminadora de genes de resistência aos antimicrobianos (CALDORIN et al., 2013). Ela é
25 indicada como biomarcadora pela sua abundância e contato direto com o trato gastrointestinal dos
26 animais, estando susceptível a todas as condições ambientais deste órgão, como alimentação,
27 aditivos e melhoradores de desempenho, além de serem frequentemente eliminadas juntamente
28 com as fezes dos animais (ROCHELLE-NEWALL et al., 2015).

29 Recentemente, bactérias que habitam o meio ambiente de diferentes locais foram
30 identificadas como importantes reservatórios de genes de resistência que podem ser transferidos
31 para outros patógenos através de elementos móveis, como por exemplo, genes que codificam a

1 produção de ESBLs que conferem resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos (JIANG et al.,
2 2011). Esses mesmos elementos móveis conferem resistência às quinolonas e fluoroquinolonas,
3 através de genes que codificam a produção de proteínas *qnr* capazes de proteger a bactéria da
4 ação do fármaco (YEH et al., 2017).

5 As cefalosporinas e fluoroquinolonas são amplamente utilizadas na medicina humana e
6 animal e são classificadas como “antimicrobianos criticamente importantes” pela Organização
7 Mundial da Saúde (WHO, 2014).

8 Desta forma, este trabalho foi realizado com os objetivos de isolar *E. coli* de amostras de
9 fezes suínas, água e solo coletadas em propriedades rurais com produção de suínos localizadas
10 em municípios do Oeste de Santa Catarina e utiliza-lá como biomarcadora do perfil fenotípico da
11 susceptibilidade antimicrobiana, e genotípico através da detecção de genes relacionados as
12 ESBLs e de genes *qnr* responsáveis pela resistência às fluoroquinolonas.

13

14 **2. Materiais e métodos**

15

16 *2.1 Amostragem e isolamento de E. coli*

17

18 Foram coletadas 306 amostras no período de março de 2016 a maio de 2017, sendo elas:
19 103 amostras de fezes suínas, 105 amostras de água e 98 amostras de solo. As coletas foram
20 realizadas em propriedades rurais com produção de suínos em vinte cidades da região oeste de
21 Santa Catarina, principalmente nos municípios de Seara e Xavantina, maiores produtores de
22 suínos per capita do estado (EPAGRI, 2017). A identificação e origem das amostras estão
23 descritas nas Tabelas 03, 04 e 05. As amostras foram acondicionadas em frascos esterilizados e
24 transportadas em caixas de isopor com gelo para evitar acréscimo de temperatura. As análises
25 foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, Imunologia e Microbiologia (LABMIM)
26 da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), no Centro de Educação Superior do
27 Oeste (CEO), em Chapecó - SC.

28

29 O isolamento de *E. coli* foi realizado de acordo com a técnica de Quinn et al. (2005) com
30 algumas adaptações para a rotina do LABMIM, onde as amostras foram incubadas em Caldo
31 Lactosado na proporção 1:10 (1 parte de amostra para nove partes de caldo lactosado) e
incubadas por 24 horas na temperatura de $36\pm 1^{\circ}\text{C}$. Em seguida, foram semeadas em placas de

1 petri contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e Ágar MacConkey e incubadas a $36\pm 1^\circ\text{C}$
2 por 24 horas. As colônias com características verde metálico no Ágar EMB e rosa pink no Ágar
3 MacConkey foram submetidas a testes bioquímicos (Ureia Ágar Base, Ágar TSI, Ágar SIM
4 Medium, e Ágar Simmons Citrate) e posteriormente incubados a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após a
5 confirmação bioquímica da colônia como sendo de *E. coli*, a mesma foi incubada em microtubos
6 contendo Tryptone Soya Ágar inclinado a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, seguido de armazenamento a -
7 20°C com glicerina esterilizada.

8 9 *2.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos*

10
11 Para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi utilizada a metodologia aprovada
12 pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018) e pela Agência Nacional de
13 Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) que consta na IN M-2 A-8 de Padronização dos Testes de
14 Sensibilidade aos Antimicrobianos por Disco-difusão. Foram testadas cinco classes de
15 antimicrobianos (ATBs) com distintos mecanismos de ação, sendo elas: da classe dos beta-
16 lactâmicos (amoxicilina associada ao ácido clavulânico 30 μg - AMC) e cefalosporina de terceira
17 geração (ceftiofur 30 μg - CTF), fluoroquinolonas (enrofloxacin 5 μg - ENO), aminoglicosídeos
18 (gentamicina 10 μg - GEM), sulfonamidas (trimetoprim associado ao sulfametoxazol 25 μg -
19 SUT) e polimixinas (colistina 10 μg - COL), todos obtidos da empresa DME® (Diagnósticos
20 Microbiológicos Especializados). Após 24 horas de incubação as placas foram submetidas a
21 leitura do teste quanto a presença de um halo de inibição de crescimento bacteriano com o auxílio
22 de uma régua e classificados de acordo com as tabelas descritas pelo CLSI (2018), classificando
23 os isolados de *E. coli* em sensíveis ou resistentes, sendo que as amostras que apresentaram perfil
24 intermediário foram consideradas sensíveis (ANVISA, 2003). Foi utilizada uma amostra
25 de *Escherichia coli* ATCC® 25922 como controle.

26 27 *2.3 Resistência a múltiplas drogas (MDR) e Índice de resistência múltipla a antimicrobianos* 28 *(IRMA)*

29
30 Foram também observados os perfis de multirresistência mais prevalentes (Resistência
31 Múltipla às Drogas - MDR) a partir dos dados do disco-difusão para determinar o número de

1 isolados de *E. coli* que foram considerados multirresistentes (resistência concomitante a três ou
2 mais classes de antimicrobianos) (FRYE; CRAY, 2007). O Índice de Resistência Múltipla
3 Antimicrobiana (IRMA) foi calculado de acordo com a metodologia descrita por Krumperman
4 (1983) e revela a relação entre o número de antimicrobianos resistentes e o número total de
5 classes testadas. O IRMA é utilizado especialmente para identificar o risco de transmissão ao ser
6 humano de exemplares com potencial de resistência a diversos antimicrobianos, onde cepas com
7 valores de IRMA acima de 0,2 são consideradas de alto risco.

8 9 *2.4 Teste de disco-aproximação para detecção de ESBLs*

10
11 Para detecção da produção de ESBLs foi utilizada a técnica do disco-aproximação
12 descrita por Jarlier et al. (1988). Com uma alça de platina devidamente flambada e resfriada, uma
13 colônia da bactéria *E. coli* foi inoculada em um tubo contendo 3 mL de caldo lactosado e
14 incubada a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 8 horas ou até atingir o nível de turbidez 0,5 na escala McFarland.
15 Utilizando-se um suabe estéril umedecido na suspensão bacteriana, a amostra foi inoculada de
16 forma suave em todas as direções da placa contendo ágar Muller-Hinton, e com auxílio de uma
17 pinça flambada e resfriada, os discos contendo cada antimicrobiano foram colocados entre uma
18 distância de 25 mm entre si. Os discos utilizados para este teste foram: amoxicilina com
19 associação ao ácido clavulânico (AMC) (30 μg) no centro da placa para visualização da sinergia
20 do inibidor de beta-lactamases, o ácido clavulânico, com os outros antimicrobianos: azetreonam
21 (ATM) (30 μg); ceftazidima (CAZ) (30 μg); ceftriaxone (CRO) (30 μg) e cefepime (CPM) (30
22 μg), seguido de incubação em estufa bacteriológica a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 18 a 24 horas. Foi utilizada
23 uma amostra de *E. coli* ATCC[®] 25922 como referência.

24 Após incubação, as placas foram submetidas à leitura do teste, sendo que nas cepas
25 consideradas positivas para ESBLs foi verificada a presença da “zona fantasma”, representada
26 pelo alargamento da zona de inibição entre os discos utilizados.

27

28

29

30

2.5 Extração do DNA e amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para pesquisa de genes relacionados a produção de ESBLs e a resistência as fluoroquinolonas

Para detecção dos genes de resistência relacionados aos antimicrobianos beta-lactâmicos foi extraído o DNA das cepas de *E. coli* positivas para produção de ESBLs no teste de disco-aproximação, utilizando o kit PureLink® Genomic DNA For Purification of Genomic DNA (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad) e os genes que codificam a produção de ESBLs: *bla*CMY-M2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1 e *AmpC* foram pesquisados por PCR convencional (T100™ Thermal Cycler® BioRad). As reações foram realizadas conforme indicado pelo Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA). Os *primers* utilizados e as condições para amplificação dos genes relacionados a produção de ESBLs *bla*CTY-M2, *bla*SHV-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1, *bla*PSE-1 foram obtidos de acordo com Chen et al. (2004) e as condições para amplificação do gene *AmpC* foram executadas de acordo com Alcaine et al. (2010) (Tabela 01).

Tabela 01. Genes de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos pesquisados, *primers*, condições para amplificação e pares de bases (Pb).

Gene	Sequência de Nucleotídeos	Condições PCR	Ciclos	Pb
<i>bla</i> CMY-2	(F) TGG CCG TTG CCG TTA TCT AC (R) CCC GTT TTA TGC ACC CAT GA			870
<i>bla</i> SHV-1	(F) GGC CGC GTA GGC ATG ATA GA (R) CCC GGC GAT TTG CTG ATT TC			714
<i>bla</i> TEM-1	(F) CAG CGG TAA GAT CCT TGA GA (R) ACT CCC CGT CGT GTA GAT AA			643
<i>bla</i> CTX-M2	(F) GGC GTT GCG CTG ATT AAC AC (R) TTG CCC TTA AGC CAC GTC AC	95°C - 10 min; 95°C - 30 s; 55°C - 1 min; 72°C - 1 min; 72°C - 7 min; 4°C - ∞	30	486
<i>bla</i> OXA-1	(F) AAT GGC ACC AGA TTC AAC TT (R) CTT GGC TTT TAT GCT TGA TG			595
<i>bla</i> PSE-1	(F) TGC TTC GCA ACT ATG ACT AC (R) AGC CTG TGT TTG AGC TAG AT			438
<i>AmpC</i>	(F) AAC ACA CTG ATT GCG TCT GAC (R) CTG GGC CTC ATC GTC AGT TA	95°C - 9,5 min; 95°C - 45 s; 59°C - 45 s; 72°C - 1 min; 72°C - 7 min; 4°C - ∞	40	1226

18

Também foram pesquisados nos isolados resistentes ao antimicrobiano enrofloxacin e nas cepas de *E. coli* produtoras de ESBLs os genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*, genes relacionados a

20

1 resistência das cepas aos antimicrobianos quinolonas e fluorquinolonas, pois a presença desses
 2 genes em plasmídeos que conferem resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos é comum e
 3 possuem a capacidade de se disseminar rapidamente (MOUMONI et al., 2017). Os *primers*
 4 utilizados para pesquisa dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* foram obtidos do estudo de Yue et al
 5 (2008), assim como as condições para amplificação via PCR e estão descritos na Tabela 2.

6 Como controle positivo da reação de PCR foi utilizado uma amostra de *Salmonella*
 7 Heidelberg para amplificação do gene *invA* já detectado previamente, onde as condições de
 8 amplificação utilizadas foram obtidas conforme descrito por Singh; Mustapha (2013) sendo:
 9 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação por 95°C por 15 segundos, anelamento e
 10 extensão 60°C por 45 segundos. O controle negativo das reações de amplificação constituiu-se
 11 em uma amostra contendo os reagentes da reação, porém sem adição de DNA extraído.

12
 13 **Tabela 02.** Genes pesquisados que conferem resistência as quinolonas e
 14 fluoroquinolonas, *primers*, condições para amplificação e pares de bases (Pb).

Gene	Seqüência de Nucleotídeos	Condições PCR	Ciclos	Pb
<i>qnrA</i>	F – TCAGCAAGAGGATTTCTCA	94°C – 5 min; 94°C - 45s; 48°C - 45s;	32	627
	R – GGCAGCACTATTACTCCCA	72°C – 1 min; 72°C – 5 min; 4°C - ∞		
<i>qnrB</i>	F – GATCGTGAAAGCCAGAAAGG			469
	R – ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	94°C – 5 min; 94°C - 45s; 53°C - 45s;	32	
<i>qnrS</i>	F – ACGACATTCGTCAACTGCAA	72°C – 1 min; 72°C – 5 min; 4°C - ∞		417
	R – TAAATTGGCACCCCTGTAGGC			

15 2.6 Eletroforese

16
 17 Para visualizar os produtos da amplificação por PCR foi utilizado a técnica da eletroforese
 18 em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídeo da marca Ludwig®, com marcador
 19 molecular de 100 pb a 2 kpb da marca ProteoLadder® a 110 V, 150 mA, 110 W por 60 minutos
 20 em fonte Locus LPS 300 HC. Em seguida foi realizada a leitura do gel em fotodocumentador
 21 com luz UV, marca Locus, com sistema de fotodocumentação L-PIXEX.
 22
 23
 24
 25

3. Resultados

3.1 Isolamento de *E. coli* e Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Das 306 amostras estudadas, 44,12% (135/306) foram positivas para *E. coli*. Nas Tabelas 03, 04 e 05 pode-se observar detalhadamente a origem das amostras e os percentuais de isolamento, onde dos 135 isolados de *E. coli*, 66,02% (68/103) eram provenientes de fezes suínas, 30,48% (32/105) de água e 35,71% (35/98) de solo, bem como os resultados de resistência e multirresistência dos isolados provenientes de cada categoria de amostras podem ser visualizados nas Tabelas 03, 04 e 05.

A resistência bacteriana geral encontrada através do teste de disco difusão foi de 82,96% (112/135), ou seja, as amostras eram positivas a pelo menos um dos antimicrobianos analisados.

1 **Tabela 03.** Locais de coleta das amostras de fezes suínas, número de amostras analisadas, número de amostras positivas para *E.*
2 *coli* e percentuais de resistência e multirresistência dos isolados.

Municípios	Origem amostras	Nº Amostras	Nº Positivas	Classe Beta-Lactâmicos		Classe Aminoglicosídeos	Classe Sulfonamidas	Classe Fluoroquinolonas	Classe Polimixinas	MDR*
				AMC	CTF	GEM	SUT	ENO	COL	
Seara										
	Creche	8 (7,77%)	6 (5,83%)	1 (1,47%)	0	1 (1,47%)	4 (5,88%)	4 (5,88%)	4 (5,88%)	2 (2,94%)
	Terminação	9 (8,74%)	8 (7,77%)	1 (1,47%)	2 (2,94%)	2 (2,94%)	8 (11,76%)	5 (7,35%)	3 (4,41%)	4 (5,88%)
	Gestação	15 (14,56%)	11 (10,69%)	1 (1,47%)	5 (7,35%)	5 (7,35%)	8 (11,76%)	4 (5,88%)	6 (8,82%)	5 (7,35%)
	Maternidade	19 (18,45%)	16 (15,54%)	4 (5,88%)	5 (7,35%)	6 (8,82%)	11 (16,19%)	9 (13,24%)	7 (10,29%)	10 (14,71%)
	Total	51 (49,52%)	41 (39,83%)	7 (10,29%)	12 (17,65%)	14 (20,59%)	31 (45,59%)	22 (32,35%)	20 (29,41%)	21 (30,88%)
Xavantina										
	Creche	4 (3,88%)	3 (2,91%)	0	2 (2,94%)	1 (1,47%)	3 (4,41%)	3 (4,41%)	3 (4,41%)	3 (4,41%)
	Terminação	12 (11,65%)	4 (3,87%)	0	0	0	2 (2,94%)	1 (1,47%)	1 (1,47%)	0
	Gestação	9 (8,74%)	5 (4,86%)	0	0	1 (1,47%)	3 (4,41%)	3 (4,41%)	0	0
	Maternidade	12 (11,65%)	8 (7,77%)	0	1 (1,47%)	2 (2,94%)	6 (8,82%)	3 (4,41%)	2 (2,94%)	2 (2,94%)
	Total	37 (35,92%)	20 (19,43%)	0	3 (4,41%)	4 (5,88%)	14 (20,58%)	10 (14,70%)	6 (8,82%)	5 (7,35%)
Outros										
	Creche	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Terminação	12 (11,65%)	4 (3,87%)	1 (1,47%)	0	3 (4,41%)	4 (5,88%)	3 (4,41%)	1 (1,47%)	3 (4,41%)
	Gestação	2 (1,94%)	2 (1,94%)	0	2 (2,94%)	1 (1,47%)	2 (2,94%)	2 (2,94%)	1 (1,47%)	2 (2,94%)
	Maternidade	1 (0,97%)	1 (0,97%)	0	0	0	0	0	1 (1,47%)	0
	Total	15 (14,56%)	7 (6,80%)	1 (1,47%)	2 (2,94%)	4 (5,88%)	6 (8,82%)	5 (7,35%)	3 (4,41%)	5 (7,35%)
Total Geral		103 (100%)	68 (66,02%)	8 (11,76%)	17 (25%)	22 (32,35%)	51 (75%)	37 (54,41%)	29 (42,65%)	31 (45,59%)

3 Beta-lactâmicos (amoxicilina associada ao ácido clavulânico - AMC) e cefalosporina de terceira geração (ceftiofur - CTF); Fluoroquinolonas (enrofloxacin -
4 ENO); Aminoglicosídeos (gentamicina - GEM); Sulfonamidas (trimetoprim associado ao sulfametoxazol - SUT) e polimixinas (colistina - COL). Resistência a
5 multiplas drogas (MDR).

6
7
8
9

1 **Tabela 04.** Locais de coleta das amostras de água, número de amostras analisadas, número de amostras positivas para *E. coli* e
2 percentuais de resistência e multirresistência dos isolados.

Municípios	Origem Amostras	Nº Amostras	Nº Positivas	Classe Beta-Lactâmicos		Classe Aminoglicosídeos	Classe Sulfonamidas	Classe Fluoroquinolonas	Classe Polimixinas	MDR*
				AMC	CTF	GEM	SUT	ENO	COL	
Seara	Poço	3 (2,86%)	1 (0,95%)	0	0	1 (3,13%)	0	0	0	0
	Açúde	1 (0,95%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Torneira Bebedouro	1 (0,95%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Fonte	11 (10,48%)	5 (4,76%)	0	0	2 (6,25%)	1 (3,13%)	2 (6,25%)	3 (9,38%)	2 (6,25%)
	Rio	2 (1,90%)	2 (1,90%)	0	0	0	1 (3,13%)	1 (3,13%)	0	0
	Poço Artesiano	13 (12,38%)	3 (2,86%)	0	1 (3,13%)	1 (3,13%)	1 (3,13%)	1 (3,13%)	2 (6,25%)	1 (3,13%)
	Fonte Caxambú	2 (1,90%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cisterna	2 (1,90%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		35 (33,33%)	11 (10,48%)	0	1 (3,13%)	4 (12,50%)	3 (9,38%)	4 (12,50%)	5 (15,63%)	3 (9,38%)
Xavantina	Poço	1 (0,95%)	1 (0,95%)	0	1 (3,13%)	1 (3,13%)	0	1(3,13%)	1 (3,13%)	1 (3,13%)
	Açúde	2 (1,90%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Torneira Bebedouro	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Fonte	10 (9,52%)	4 (3,81%)	0	0	1 (3,13%)	3 (9,38%)	0	1 (3,13%)	1 (3,13%)
	Rio	1 (0,95%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Poço Artesiano	6 (5,71%)	3 (2,86%)	0	1 (3,13%)	1 (3,13%)	1 (3,13%)	1(3,13%)	0	0
	Fonte Caxambú	1 (0,95%)	1 (0,95%)	1 (3,13%)	0	0	1 (3,13%)	0	0	0
	Cisterna	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		21 (20,00%)	9 (8,57%)	1 (3,13%)	2 (6,25%)	3 (9,38%)	5 (15,63%)	2 (6,25%)	2 (6,25%)	2 (6,25%)
Outros	Poço	10 (9,52%)	1 (0,95%)	0	0	0	0	0	0	0
	Açúde	5 (4,76%)	2 (1,90%)	0	0	0	1 (3,13%)	0	0	0
	Torneira Bebedouro	5 (4,76%)	2 (1,90%)	1 (3,13%)	0	0	1 (3,13%)	0	1 (3,13%)	1 (3,13%)
	Fonte	22 (20,95%)	5 (4,76%)	1 (3,13%)	1 (3,13%)	0	2 (6,25%)	0	1 (3,13%)	1 (3,13%)
	Rio	6 (5,71%)	1 (0,95%)	0	0	0	1 (3,13%)	0	1 (3,13%)	0
	Poço Artesiano	2 (1,90%)	1 (0,95%)	0	0	0	0	0	0	0
	Fonte Caxambú	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cisterna	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		49 (46,67%)	12 (11,41%)	2 (6,25%)	1 (3,13%)	0	5 (15,63%)	0	3 (9,38%)	2 (6,25%)
Total Geral		105 (100%)	32 (30,46%)	3 (9,38%)	4 (12,50%)	7 (21,88%)	13 (40,63%)	6 (18,75%)	10 (31,25%)	7 (21,88%)

1 **Tabela 05.** Locais de coleta das amostras de solo, número de amostras analisadas, número de amostras positivas para *E. coli* e
 2 percentuais de resistência e multirresistência dos isolados.

Municípios	Origem amostras	Nº Amostras	Nº Positivas	Classe Beta-Lactâmicos		Classe Aminoglicosídeos	Classe Sulfonamidas	Classe Fluoroquinolonas	Classe Polimixinas	MDR*
				AMC	CTF	GEM	SUT	ENO	COL	
Seara	Pastagem	7 (7,14%)	3 (3,06%)	1 (2,86%)	0	0	3 (8,57%)	1 (2,86%)	3 (8,57%)	3 (8,57%)
	Horta	1 (1,02%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lavoura	11 (11,22%)	4 (4,08%)	1 (2,86%)	1 (2,86%)	4 (11,43%)	3 (8,57%)	3 (8,57%)	4 (11,43%)	3 (8,57%)
	Barranco Próximo às Instalações	10 (10,20%)	5 (5,10%)	2 (5,71%)	1 (2,86%)	1 (2,86%)	3 (8,57%)	1 (2,86%)	3 (8,57%)	2 (5,71%)
		2 (2,04%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		31 (31,63%)	12 (12,24%)	4 (11,43%)	2 (5,71%)	5 (14,29%)	9 (25,71%)	5 (14,29%)	10 (28,57%)	8 (22,85%)
Xavantina	Pastagem	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Horta	1 (1,02%)	1 (1,02%)	0	0	1 (2,86%)	1 (2,86%)	0	0	0
	Lavoura	15 (15,31%)	7 (7,14%)	0	0	0	4 (11,43%)	2 (5,71%)	2 (5,71%)	1 (2,86%)
	Barranco Próximo às Instalações	2 (1,02%)	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		18 (18,37%)	8 (8,16%)	0	0	1 (2,86%)	5 (14,29%)	2 (5,71%)	2 (5,71%)	1 (2,86%)
Outros	Pastagem	8 (8,16%)	4 (4,08%)	1 (2,86%)	0	1 (2,86%)	2 (5,71%)	0	0	0
	Horta	3 (3,06%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lavoura	15 (15,31%)	3 (3,06%)	0	1 (2,86%)	0	2 (5,71%)	0	2 (5,71%)	1 (2,86%)
	Barranco Próximo às Instalações	17 (17,35%)	4 (4,08%)	1 (2,86%)	2 (5,71%)	2 (5,71%)	2 (5,71%)	1 (2,86%)	4 (11,43%)	2 (5,71%)
		6 (6,12%)	4 (4,08%)	1 (2,86%)	1 (2,86%)	1 (2,86%)	2 (5,71%)	2 (5,71%)	3 (8,57%)	1 (2,86%)
Total		49 (50,00%)	15 (15,31%)	3 (8,57%)	4 (11,43%)	4 (11,43%)	8 (22,86%)	3 (8,57%)	9 (25,71%)	4 (11,43%)
Total Geral		98 (100%)	35 (35,71%)	7 (20%)	6 (17,14%)	10 (28,57%)	22 (62,86%)	10 (28,57%)	21 (60%)	12 (34,29%)

Os maiores percentuais de resistência obtidos tanto em geral, quanto para os isolados provenientes de fezes foram para os antimicrobianos sulfametoxazol associado ao trimetoprim (63,70% e 75%, respectivamente), colistina (45,19% e 42,65%, respectivamente) e enrofloxacina (39,26% e 54,41%, respectivamente) (Figura 01). Para os isolados provenientes de água, os maiores índices de resistência continuam sendo para os antimicrobianos sulfametoxazol associado ao trimetoprim (40,63%) e colistina (31,25%), mas nota-se um acréscimo para a classe dos beta-lactâmicos (AMC+CTF) e gentamicina ambas com 21,88% de resistência.

Para os isolados oriundos de solo os maiores percentuais de resistência permanecem sendo do sulfametoxazol associado ao trimetoprim e colistina, com 62,86% e 60% respectivamente, seguido pelos beta-lactâmicos (AMC+CTF) com 37,14% e gentamicina e enrofloxacina com 28,57% cada.

Quanto aos níveis de multirresistência (MDR) foi possível observar que 37,04% (50/135) dos isolados possuíam resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos diferentes, onde as cepas provenientes de fezes representam 62% (31/50) do total de amostras multirresistentes (Tabela 06).

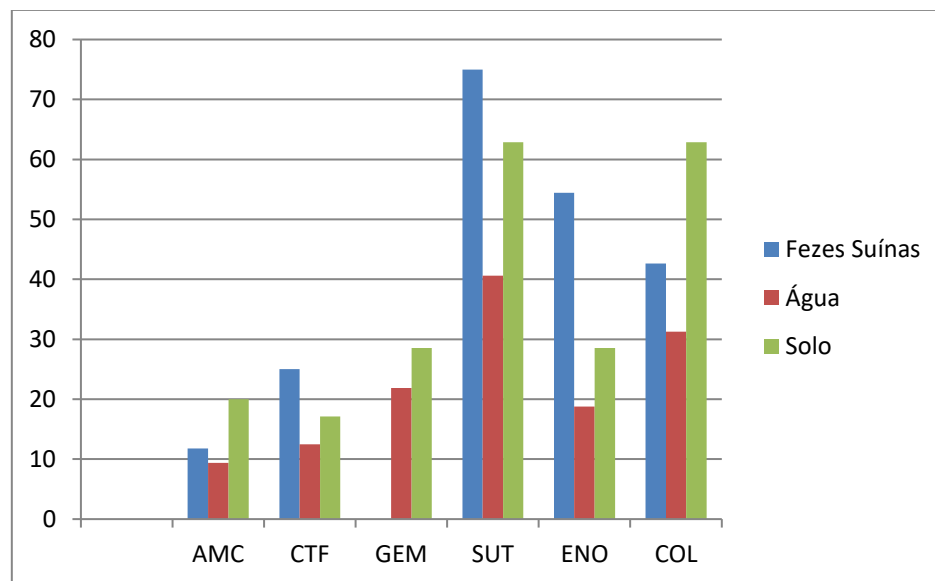


Figura 01. Resistência antimicrobiana aos seis antibióticos testados de isolados de *E. coli* de diferentes fontes (fezes suínas, água e solo). Amoxicilina associada ao ácido clavulânico (AMC), Ceftiofur (CTF), Enrofloxacina (ENO), Gentamicina (GEM), Trimetoprim associado ao sulfametoxazol (SUT) e Colistina (COL).

1 3.2 Perfis de resistência a múltiplas drogas (MDR) e Índice de resistência múltipla a
2 antimicrobianos (IRMA)

3
4 A Tabela 6 mostra os perfis de multirresistência mais prevalentes (Resistência Múltipla às
5 Drogas - MDR) e o Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (IRMA) obtidos através
6 do teste de disco-difusão das cepas de *E. coli*. Os principais perfis de multirresistência
7 observados foram o perfil A [GEM-SUT-ENO-COL] com 16% (8/50) das amostras
8 multirresistentes, seguido pelos perfis B [CTF-GEM-SUT-ENO-COL] e C [SUT-ENO-COL]
9 com 12% (6/50) cada.

10 Quanto aos resultados de IRMA, 78% (39/50) das amostras multirresistentes obtiveram
11 valores acima de 0,2 indicando alto potencial de risco de transmissão aos seres humanos.
12 Individualmente, os perfis B (seis isolados) e I (dois isolados) possuem valores de IRMA igual a
13 1, ou seja, os isolados são resistentes a todas as classes de antimicrobianos testadas.

14
15 **Tabela 06.** Principais perfis de Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) e Índice de
16 Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (IRMA) de isolados *E. coli* provenientes de fezes
17 suínas, água e solo.

Identificação do Perfil	Perfil de MDR	Fonte Isolados	IRMA	Total	%
A	GEM-SUT-ENO-COL	Fezes (4), Solo (3), Água (1)	0,80	8/50	16
B	CTF-GEM-SUT-ENO-COL	Fezes (3), Solo (2), Água (1)	1	6/50	12
C	SUT-ENO-COL	Fezes (4), Solo (2)	0,60	6/50	12
D	CTF-GEM-SUT-COL	Fezes (3), Solo (1)	0,80	4/50	8
E	AMC-SUT-COL	Fezes (1), Solo (2), Água (1)	0,60	4/50	8
F	CTF-SUT-ENO	Fezes (4)	0,60	4/50	8
G	GEM-SUT-COL	Fezes (1), Solo (1), Água (1)	0,60	3/50	6
H	GEM-SUT-ENO	Fezes (2)	0,60	2/50	4
I	AMC-CTF-GEM-SUT-ENO-COL	Fezes (1), Solo (1)	1	2/50	4
J,K,L,M,N, O,P,Q,R,S,T	Outros Perfis*	Fezes (8), Solo (1), Água (2)	0,17	1/50	2

18 *Perfis de MDR que correspondem a apenas 1 (um) isolado. % - percentual de amostras; Beta-lactâmicos
19 (amoxicilina associada ao ácido clavulânico - AMC) e cefalosporina de terceira geração (ceftiofur - CTF);
20 Fluoroquinolonas (enrofloxacina - ENO); Aminoglicosídeos (gentamicina - GEM); Sulfonamidas (trimetoprim
21 associado ao sulfametoxazol - SUT) e polimixinas (colistina - COL).
22

3.3 Teste de disco-aproximação para detecção de ESBLs

Dos 135 isolados submetidos ao teste de disco-aproximação foi possível visualizar a zona irregular de inibição, também chamada zona fantasma (Figura 02) para a detecção da presença de bactérias produtoras de beta-lactamases, em 7,41% (10/135).

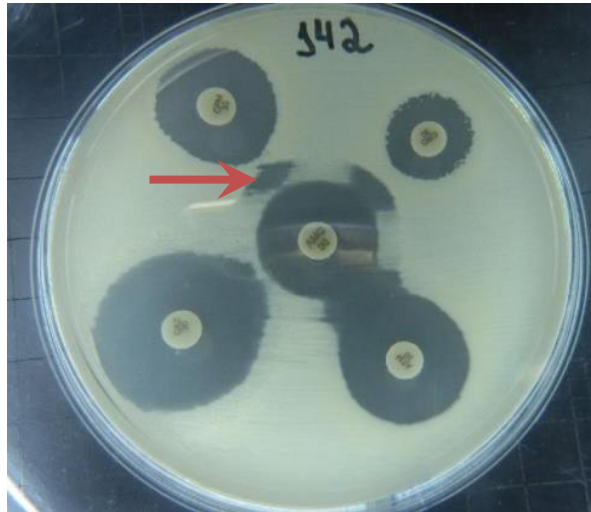


Figura 02. Indicação da formação da zona-fantasma em placa contendo ágar Muller-Hinton devido a sinergia do disco de amoxicilina associada ao ácido clavulânico (AMC) no centro, com os demais, aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), ceftriaxone (CRO) e cefepime (CPM).

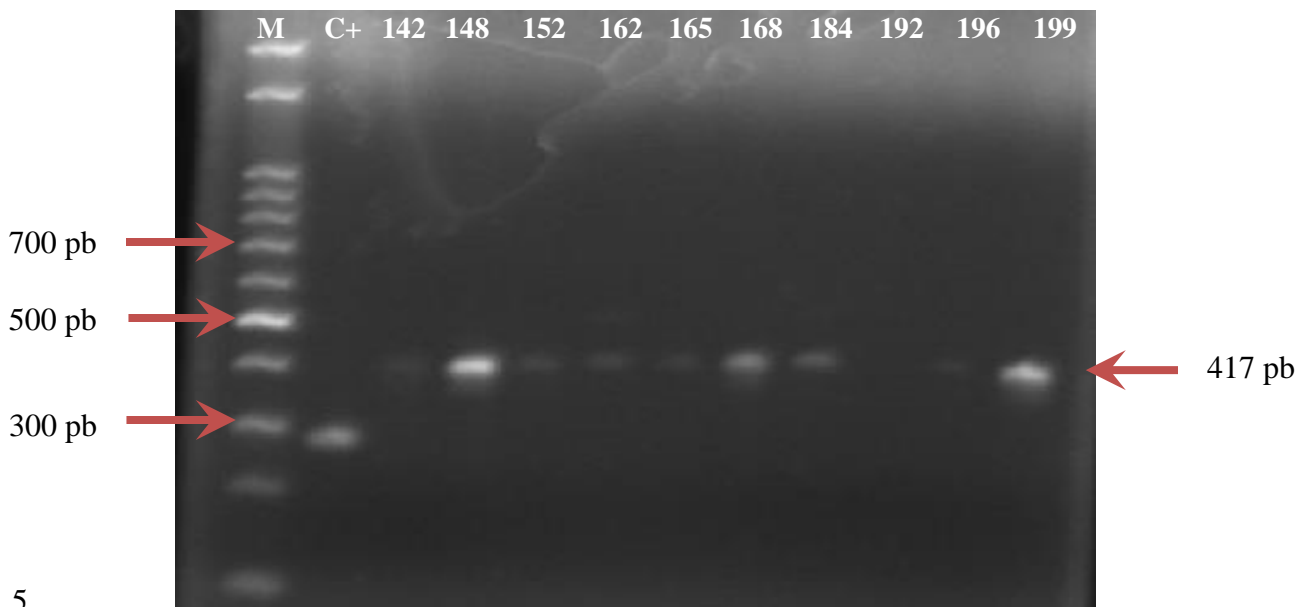
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para pesquisa de genes relacionados a produção de ESBLs e de resistência às fluoroquinolonas

Dos sete genes que conferem resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos pesquisados nos isolados positivos para produção de ESBLs, foi detectada positividade para os genes *bla*TEM-1 em 60% (6/10) dos isolados, seguido dos genes *bla*CMY-M2 com 50% (5/10) e *Amp*C com 20% (2/10) (Tabela 07). Já os genes *bla*SHV-1, *bla*CTX-M2, *bla*OXA-1 e *bla*PSE-1 não foram detectados. Para os genes que conferem resistência as fluoroquinolonas *qnr*A, *qnr*B e *qnr*S, os resultados da PCR demonstraram uma prevalência de 90% (9/10) para o gene *qnr*S (Figura 03). Os genes *qnr*A e *qnr*B não foram detectados nas cepas de *E. coli* produtoras de ESBLs.

1 **Tabela 07.** Resultados de IRMA e da PCR dos os genes *bla*TEM-1, *bla*CMY-M2, *Amp*C
 2 e *qnr*S pesquisados nos isolados positivos para produção de ESBLs no teste de disco-
 3 aproximação.

Isolado	Fonte	Local de Coleta	Município	IRMA	<i>bla</i> TEM-1	<i>bla</i> CMY-M2	<i>Amp</i> C	<i>qnr</i> S
142	Fezes	Maternidade	Seara	0,6	X	X	X	X
148	Fezes	Terminação	Seara	0,2		X		X
152	Fezes	Maternidade	Seara	0,8				X
162	Fezes	Gestação	Seara	0,4	X			X
165	Fezes	Creche	Seara	1				X
168	Fezes	Gestação	Seara	0,8	X	X		X
184	Fezes	Gestação	Seara	0,4		X	X	X
192	Fezes	Maternidade	Seara	1	X	X		
196	Solo	Próximo as instalações	Jaborá	1	X			X
199	Solo	Próximo as instalações	Concórdia	0,2	X			X

4



5

6 **Figura 03.** Amplificação do gene *qnr*S (417 pb) em gel de agarose a 1%. M: Marcador
 7 molecular com peso de 100 pb; C+ controle positivo com *Salmonella* Heidelberg para o gene
 8 *inv*A (284 pb); Nas amostras de número 142, 148, 152, 162, 165, 168, 184, 196 e 199 podemos
 9 visualizar a amplificação do gene *qnr*S.

10

Na Tabela 08 observam-se os resultados da PCR para as cepas resistentes à enrofloxacin sendo 46 isolados (pois das 53 resistentes à enrofloxacin, sete eram produtoras de ESBLs, que já foram analisadas anteriormente), 17,39% das cepas apresentaram a presença do gene *qnrS* (8/46), uma para o gene *qnrB* 2,17% (1/46) e nenhuma para o gene *qnrA*.

Tabela 08. Resultados de IRMA e para os genes *qnrB* e *qnrS* nos isolados de *E. coli* resistentes à enrofloxacin.

Isolado	Fonte	Local de Coleta	Município	IRMA	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
144	Água	Poço Artesiano	Seara	1	X	
177	Fezes	Maternidade	Seara	0,8		X
179	Fezes	Maternidade	Seara	1		X
189	Fezes	Maternidade	Seara	0,6		X
195	Água	Rio	Seara	0,4		X
217	Solo	Lavoura	Seara	0,8		X
232	Fezes	Creche	Xavantina	1		X
273	Fezes	Maternidade	Xavantina	0,4		X
277	Fezes	Terminação	Xavantina	0,4		X

4. Discussão

A distribuição ambiental de *E. coli* resistente aos antimicrobianos pode agravar os problemas com a disseminação de genes de resistência, pois é uma das principais bactérias onde elementos genéticos móveis como plasmídeos estão sendo detectados (SILVA et al., 2015). Em nosso estudo, aproximadamente um terço das amostras de água analisadas estavam contaminadas por material de origem fecal, resultado que corrobora com o obtido por Egervarn et al. (2017), que ao pesquisar *E. coli* em águas superficiais da Suécia detectaram 27,55% de positividade. Malheiros et al. (2009) avaliaram a contaminação bacteriológica de águas subterrâneas da região oeste de Santa Catarina e das 212 amostras analisadas 75,94% estavam impróprias para o consumo humano, demonstrando alta carga microbiológica nos mananciais hídricos desta região. Diversos são os fatores que podem contribuir para a contaminação das águas nas propriedades rurais, como o manejo ineficiente dos dejetos humanos e animais, provocando a contaminação dos recursos hídricos, além da falta de higienização ou de proteção contra roedores e animais

1 silvestres das caixas d'água e fontes, podendo aumentar a prevalência desta bactéria nas fontes de
2 água (SATAKE et al., 2012).

3 Nas amostras de fezes suínas analisadas, 66,02% apresentaram positividade para a bactéria
4 *E. coli*, o que pode ser explicado por ela fazer parte da microbiota intestinal autóctone dos suínos,
5 responsável por contribuir para a manutenção do equilíbrio intestinal dos animais, com exceção de
6 algumas cepas patogênicas que são classificadas de acordo com seus traços de virulência e que
7 podem causar doenças em seres humanos e animais (ROMER; WIELER; SCHIERACK, 2012).
8 Mas os microrganismos provenientes dos dejetos dos animais e também de humanos, podem
9 contaminar o solo através da irrigação, água da chuva em áreas contendo fezes de animais,
10 aplicação de dejetos em lavouras e também esgoto não tratado (BRADFORD et al., 2013). Das 98
11 amostras de solo analisadas, 35,71% foram positivas para *E. coli*, e estudos demonstram a
12 habilidade dessa bactéria em sobreviver e se replicar por longos períodos de tempo no meio
13 ambiente, e com a adição de dejetos no solo com finalidade de adubação, pode haver um
14 acréscimo da concentração da *E. coli* capaz de aumentar o risco de propagação da resistência
15 bacteriana à antibióticos nesse ambiente (BRADFORD et al., 2013).

16 Outro dado importante que devemos salientar é o percentual de multirresistência
17 encontrado, já que um terço (37,04%) dos isolados apresentaram resistência a pelo menos três
18 classes de antimicrobianos e 78% (39/50) das amostras multirresistentes obtiveram valores acima
19 de 0,2, o que representa altos riscos de transmissão para seres humanos de exemplares com
20 potencial de resistência a diversos antimicrobianos (KRUMPERMAN, 1983).

21 Dos isolados de *E. coli*, 75% apresentaram resistência para sulfametoxazol associado aos
22 trimetoprim. A resistência a estes antimicrobianos tem sido amplamente relatada em casos de
23 diarreia em leitões causada por *E. coli* (SOBESTIANSKY E BARCELLOS, 2001) e também em
24 cepas de *E. coli* comensais isoladas de suínos e do ambiente (COSTA et al., 2006). O segundo
25 antimicrobiano que apresentou maior percentual geral de resistência neste estudo foi a colistina
26 (45,19%). Este antimicrobiano já foi amplamente utilizado como melhorador de desempenho,
27 mas pela recente detecção de genes *mcr-1* que confere resistência plasmidial às bactérias
28 possibilitando maior facilidade na disseminação e a sua importância crítica à saúde humana, a
29 utilização deste antibiótico para esta finalidade foi proibida no Brasil de acordo com a Instrução
30 Normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016 (BRASIL, 2016).

1 Foram verificadas elevadas taxas de resistência à antimicrobianos de uso mais recente e
2 de amplo espectro, como a enrofloxacina da classe das fluoroquinolonas com 39,26% dos
3 isolados resistentes. Hu et al. (2017), isolaram *E. coli* em 171 (72,2%) de 237 amostras de fezes
4 de suínos na Coréia do Sul e detectaram resistência a fluoroquinolonas em 34,5% dos isolados. A
5 resistência as fluoroquinolonas também foi detectada em isolados de águas residuais na Polônia,
6 onde 12,4% dos isolados foram resistentes a esta classe de antimicrobianos (OSINSKA et al.,
7 2017). Com a aplicação de dejetos não tratados previamente no solo, não se introduz apenas
8 nutrientes e matéria orgânica, mas também agentes antimicrobianos, incluindo as
9 fluoroquinolonas, onde altas concentrações de enrofloxacina, ciprofloxacina e norfloxacina foram
10 encontradas em ambientes adubados com dejetos animais (XIONG et al., 2015). Nas
11 enterobactérias, um dos principais mecanismos de resistência às quinolonas e fluoroquinolonas é
12 mediado por plasmídeos que carregam genes responsáveis pela síntese de proteínas qnr que por
13 sua vez bloqueiam as topoisomerases (HU et al., 2017). A resistência às fluoroquinolonas através
14 de plasmídeos transferíveis é considerada baixa, mas facilita o surgimento de resistência de alto
15 nível quando o antimicrobiano é utilizado em condições terapêuticas (MOUMONI et al., 2017).
16 Estes mesmos plasmídeos podem conter outros genes de resistência, tais como os que conferem
17 resistência aos beta-lactâmicos e cefalosporinas, através da produção de ESBLs (JACOBY;
18 STRAHILEVITZ; HOOPER, 2014).

19 Os antimicrobianos beta-lactâmicos são os principais suportes de tratamento em casos de
20 infecções extraintestinais ocasionadas por *E. coli* patogênicas (BAJAJ et al., 2016). Mais de 400
21 ESBLs já foram descritas até o momento e normalmente são derivadas de mutações pontuais dos
22 grupos TEM, SHV e CTX-M, com 183, 134 e 103 variantes, respectivamente (BARGUIGUA et
23 al., 2011). Abraham et al. (2015) avaliaram a resistência de 114 isolados de *E. coli* provenientes
24 de suínos e detectaram 14,91% de resistência à amoxicilina associada ao ácido clavulânico e
25 2,63% ao ceftiofur, resultados estes, menores do que os encontrados nesta pesquisa, onde a
26 resistência encontrada foi de 25% e 11,76%, respectivamente. Dados que podem ser explicados
27 pela pressão seletiva através de elevadas taxas de utilização destes antimicrobianos na produção
28 animal, principalmente em regiões com altos índices de criação de suínos (GEBREYES et al.,
29 2017). O aumento da resistência às cefalosporinas de amplo espectro em *E. coli* e outros
30 microrganismos, como a *Salmonella* Heidelberg, é de interesse significativo para a saúde pública,

1 uma vez que as cefalosporinas de terceira geração são usadas para tratar crianças com formas
2 graves de salmonelose (NEVES et al., 2016; GIURIATTI et al., 2017).

3 A resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos para os isolados provenientes de água,
4 foram de 12,50% e 9,38%, para ceftiofur e amoxicilina associada ao ácido clavulânico,
5 respectivamente. E para os isolados oriundos de solo foi possível detectar 20% de resistência para
6 amoxicilina associada ao ácido clavulânico e 17,14% para o ceftiofur. Em um estudo efetuado
7 por Jiang et al. (2011), no qual foi avaliada a alta prevalência e distribuição de isolados de *E. coli*
8 multirresistentes na China, relataram 27,3% dos isolados de água e 18,8% dos isolados
9 provenientes de solo apresentaram resistência à amoxicilina, demonstrando a capacidade de
10 resistência bacteriana em isolados provenientes do ambiente e que podem estar relacionados a
11 disseminação ambiental de cepas oriundas da produção animal (EGERVARN et al., 2017).
12 Denota-se pelas referências estrangeiras citadas, a escassez de dados brasileiros referentes a esta
13 matéria, indicando a necessidade de mais estudos para melhor avaliação da contaminação
14 ambiental da resistência aos antimicrobianos.

15 Ainda mais preocupante, é a capacidade de produção e disseminação de genes que
16 codificam ESBLs. Em nosso estudo, das 135 cepas isoladas de *E. coli*, 7,41% foram positivas
17 para produção de ESBLs através do teste fenotípico, sendo oito provenientes de fezes e duas de
18 solo. Recentemente, animais de produção saudáveis têm sido considerados reservatórios de
19 ESBLs, produzidas por enterobactérias, principalmente *E. coli* e tais isolados foram encontrados
20 em diferentes países, como por exemplo o Reino Unido (RANDALL et al., 2014). Gao et al.
21 (2015), avaliaram a produção de ESBLs em cepas de *E. coli* isoladas de amostras fecais de suínos
22 e ambientais na província de Shandong na China e detectaram 43% de produção de ESBLs em
23 isolados de fezes e 8,57% em isolados provenientes de solo, resultados que indicam possíveis
24 rotas de transmissão de produtores de ESBLs de fazendas de produção de alimentos para o
25 ambiente.

26 No Brasil, o gene de ESBL mais predominante já descrito em estudos anteriores
27 proveniente de diversas fontes é o CTX-M e suas variantes CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9
28 (SILVA; LINCOPAM, 2012). Mas, em nosso estudo o gene *bla*TEM-1 foi o mais prevalente,
29 sendo positivo para 60% dos isolados produtoras de ESBLs, seguido pelo gene *bla*CMY-M2
30 (50%), demonstrando a emergência de outros genes codificadores de ESBLs, aumentando ainda
31 mais as preocupações com o surgimento e disseminação destes genes. Resultados estes que

1 corroboram com os obtidos por Changkaew et al. (2015) que avaliaram a presença de *E. coli*
2 produtora de ESBLs em suínos saudáveis na Tailândia e dos 122 isolados analisados, detectaram
3 o gene *bla*TEM em 33,61% das cepas. Jahanbaksh et al. (2016), encontraram o gene *bla*CMY-
4 M2 em 96,5% e o gene *bla*TEM-1 em 49,4% das cepas de *E. coli* previamente resistentes ao
5 ceftiofur isoladas de suínos em Quebec no Canadá. Ambos demonstram altos índices de cepas
6 patogênicas produtoras de ESBLs.

7 O uso habitual de cefalosporinas de terceira e quarta geração como terapia ou aditivos
8 alimentares na produção de suínos pode selecionar alta resistência bacteriana (GAO et al., 2015),
9 pois uma questão de crescente preocupação, é que os genes que codificam ESBLs são
10 frequentemente encontrados em coexistência no mesmo plasmídeo com genes e integrons
11 responsáveis pela resistência as fluoroquinolonas (XU et al., 2015), e esta afirmação pode ser
12 relacionada com os resultados obtidos em nosso estudo, onde dos dez isolados de *E. coli*
13 produtores de ESBLs, nove apresentaram positividade para o gene *qnrS*, sendo que o isolado 142
14 proveniente de fezes apresentou positividade concomitante para os genes *bla*TEM, *bla*CMY-M2,
15 *AmpC* e *qnrS*.

16 No estudo realizado por Gao et al. (2015) foram detectados genes relacionados com a
17 resistência a fluoroquinolonas em 87,4% dos 198 isolados positivos para produção de ESBLs em
18 *E. coli* provenientes de leitões no pós-desmame, sendo que o gene com maior prevalência foi o
19 *qnrS* e relataram que a disseminação de determinantes *qnr* pode ocasionar o rápido
20 desenvolvimento da resistência às fluoroquinolonas, pois apesar de conferirem resistência de
21 baixo nível, podem acarretar a seleção de cepas resistentes de alto nível com mutações
22 cromossomais.

23 É a primeira vez que o gene *qnrS* é reportado em cepas de *E. coli* produtoras de ESBLs
24 isoladas de solo no Brasil, o que demonstram a prevalência deste gene em cepas de origem
25 ambiental. Além disso, esta é a primeira detecção reportada do gene *qnrB* em *E. coli* proveniente
26 de água subterrânea no Brasil, demonstrando a contaminação de fontes hídricas por elementos
27 móveis carreadores de genes de resistência às fluoroquinolonas.

28 Ainda, 17,39% das cepas resistentes ao antimicrobiano enrofloxacin isoladas de água,
29 solo e fezes apresentaram o gene *qnrS* neste estudo. Chen et al. (2012) pesquisaram genes *qnr* em
30 isolados provenientes de humanos, animais e ambiente entre 1993 e 2010 na China, e dos 198
31 isolados de suínos 8,6% possuíam o gene *qnrS* e em 44 cepas provenientes do ambiente (solo

1 superficial, esgoto, água potável e de lagoa) foi possível detectar o gene *qnrS* em 20,5% e o gene
2 *qnrB* em 6,8% dos isolados. O gene *qnrA* não foi detectado em nosso estudo, o que pode ser
3 justificado pela baixa prevalência deste gene em *E. coli* na maioria dos estudos já realizados
4 (YUE et al., 2008).

5 A identificação de genes *qnr* e codificadores de ESBLs em isolados de *E. coli* de origem
6 animal e ambiental aponta para a necessidade de adequado saneamento rural, visto a
7 possibilidade de contaminação de águas e alimentos com microrganismos resistentes. O Brasil e
8 principalmente a região Oeste de Santa Catarina são importantes produtores de carne suína e a
9 possibilidade de disseminação destes genes para outros microrganismos patogênicos através de
10 elementos genéticos móveis como plasmídeos, integrons e transposons por conjugação
11 bacteriana, podem afetar consideravelmente a produção animal, assim como a saúde humana.

12 As taxas obtidas de resistência aos antimicrobianos dos isolados de *E. coli*, demonstram a
13 necessidade do uso racional dessas drogas a fim de evitar a perda de eficácia e dificuldade no
14 combate de bactérias patogênicas, além de tratamento adequado de resíduos provenientes da
15 produção animal e também de esgotos e efluentes humanos e industriais.

16

17 **5. Conclusão**

18

19 É possível concluir que grande parte das cepas de *E. coli* isoladas são resistentes a
20 antimicrobianos e carregam genes de resistência à quinolonas, fluoroquinolonas e ESBLs.
21 Resultados preocupantes à saúde pública, pois, a possibilidade de disseminação de genes de
22 resistência entre cepas da mesma espécie e espécies diferentes dificulta o tratamento de afecções
23 graves em humanos e animais, salientando ainda mais a necessidade de uso racional de agentes
24 antimicrobianos e o tratamento adequado de dejetos e efluentes.

25

26 **6. Agradecimentos**

27

28 Pelo apoio financeiro fornecido pela CAPES, FAPESC, UDESC-Oeste e o Programa de
29 Pós Graduação em Zootecnia para realização desta pesquisa.

7. Referências do manuscrito

Abraham, S., 2015. First detection of extended-spectrum cephalosporin- and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in Australian food-producing animals. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, p. 273-277.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. 2017. Resumo do setor de suínos. **Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/resumo>**. Acesso em 23 de outubro de 2017.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. 2003. Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição. **Brasil**.

Alcaine, S. D., Sukhnanand, S. S., Warnick, L. D., Su, W. L., McGann, P., McDonough, P., Wiedmann, M., 2010. Ceftiofur-resistant *Salmonella* strains isolated from dairy farms represent multiple widely distributed subtypes that evolved by independent horizontal gene transfer. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10.

Bajaj, P., Singh, N. S., Viridi, J. S., 2016. *Escherichia coli* beta-lactamases: what really matters. **Frontiers in Microbiology**, n 7, p. 1-14.

Barguigua, A., El Otmani, F., Talmi, M., Bourjilat, F., Haouzane, F., Zerouali, K., et al., 2011. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the community in Morocco. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 1344-1352.

Bradford, S. A., Morales, V. L., Zhang, W., Harvey, R.W., Packman, A.I., Mohanran, A., Welty, C., 2013. Transport and fate of microbial pathogens in agricultural settings. **Critical Review in Environmental Science & Technology**, v.43, p. 775-893.

Brasil, 2016. Instrução Normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016. Diário Oficial da União.

- 1 Caldorin, M., Almeida, I. A. Z., Peresi, J. T. M., Alves, E. C., 2013. Ocorrência de *Escherichia*
2 *coli* produtora de toxina shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **Boletim**
3 **Epidemiológico Paulista**, v.10, p. 4-20.
4
- 5 Changkaew, K., Intarapuk, A., Utrarachkij, F., Nakajima, C., Suthienkul, O., Suzuki, Y., 2015.
6 Antimicrobial resistance, extended-spectrum beta-lactamase productivity, and class 1 integrons in
7 *Escherichia coli* from healthy swine. **Journal of Food Protection**, v. 78, p. 1442-1450.
8
- 9 Chen, S., Zhao, S., White, D. G., Schroeder, C. M., Lu, R., Yang, H., Mcdermott, P. F., Ayers,
10 S., Meng, J., 2004. Characterization of meats *Salmonella* serovars isolated from retail multiple-
11 antimicrobial-resistant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 1, p. 1-7.
12
- 13 Chen, X., Zhang, W., Pan, W., Yin, J., Gao, S., Jiao, X., 2012. Prevalence of qnr, aac(6')-Ib-cr,
14 qpA and oqxAB in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment.
15 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 3423-3427.
16
- 17 Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2018. Performance Standards for
18 Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement.
- 19 Costa, M. M. Da., 2006. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos
20 antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa**
21 **Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 5-8.
22
- 23 Egervarn, M., Englund, S., Ljunge, M., Wiberg, C., Finn, M., Lindblad, M., Borjesson, S., 2017.
24 Unexpected common occurrence of transferable extended spectrum cephalosporinase producing
25 *Escherichia coli* in Swedish surface waters used for drinking water supply. **Science of the Total**
26 **Environment**, v. 587-588, p. 466-472.
27
- 28 EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. 2014. Síntese
29 Anual da Agricultura de Santa Catarina, p. 2013-2014.
30

- 1 EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. 2017.
2 Produção de carnes de bovinos, suínos e frangos abatidos, Brasil e Santa Catarina de 2007 a
3 2016. Acesso em 23 de fevereiro de 2018. Disponível em:
4 http://www.epagri.sc.gov.br/?page_id=2623
5
- 6 Frye, J. G., Cray, P. J., 2007. Prevalence, distribution and characterization of ceftiofur resistance
7 in *Salmonella enterica* isolated from animals in the USA from 1999 to 2003. **Antimicrobial**
8 **Agents**, v. 30, p. 134-142.
9
- 10 Gao, L., Tan, Y., Zhang, X., Hu, J., Miao, Z., Wei, L., Chai, T., 2015. Emissions of *Escherichia*
11 *coli* carrying extended-spectrum beta-lactamase resistance from pig farms to the surrounding
12 environmental. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12,
13 p. 4203-4213.
14
- 15 Giuriatti, J., Stefani, L. M., Brisola, M. C., Crecencio, R. B., Bitner, D. S., Faria, G. A., 2017.
16 *Salmonella* Heidelberg: Genetic profile of its antimicrobial resistance related to extended
17 spectrum beta-lactamases (ESBLs). **Microbial Pathogenesis**, v. 109, p. 195-199.
18
- 19 Gebreyes, W. A., Wittum, T., Habing, G., Alali, W., Usui, M., Suzuki, S., 2017. Chapter
20 4: spread of antibiotic resistance in food animal production systems. **Foodborne Diseases**, 3rd ed,
21 p. 105-130.
22
- 23 Hu, Y. S., Shin, S., Park, Y. H., Park, K. T., 2017. Prevalence and mechanism of fluoroquinolone
24 resistance in *Escherichia coli* isolated from swine feces in Korea. **Journal of Food Protection**, v.
25 80, p. 1145-1151.
26
- 27 Jacoby, G. A., Strahilevitz, J., Hooper, D. C., 2014. Plasmid-mediated quinolone resistance.
28 **Microbiology Spectrum**, v.2, p. 1-24.
29
- 30 Jahanbaksh, S., Smith, M. G., Kohan-ghadr, H. R., Letellier, A., Abraham, S.; Trott, D.
31 J.; Fairbrother, J. M., 2016. Dynamics of extended-spectrum cephalosporin resistance in

- 1 pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in Quebec, Canada. **International**
2 **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, p. 194-202.
- 3
- 4 Jarlier V., Nicolas M. H., Fournier G., Philippon A. 1988. Extended broad-spectrum beta-
5 lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*:
6 hospital prevalence and susceptibility patterns. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, p. 867-878.
- 7
- 8 Jiang, H. X., Lu, D. H., Chen, Z. L., Wang, X. M., Chen, J. R., Liu, Y. H., Liao, X. P., Liu, J. H.,
9 Zeng, Z. L., 2011. High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia*
10 *coli* isolates in pigs and poultry in China. **The Veterinary Journal**, v. 187, p. 99-103.
- 11
- 12 Krumperman, P. H., 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify
13 high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**, v. 46,
14 p. 165-170.
- 15
- 16 Malheiros, P. S. da, Schäfer, D. F., Herbert, I. M., Capuani, S. M., Silva, E. M. Da, Sardiglia, C.
17 U., Scapin, D., Rossi, E. M., Brandelli, A., 2009. Bacteriological contamination of groundwater
18 of the western area of Santa Catarina, Brazil. **Revista Instituto Adolf Lutz**, v. 68, p. 305-308.
- 19 Moumoni, A., Diagbouga, S., Nadembéga, C., Dabiré, A. M., Salah, F., Obiri-yeboah, D.,
20 Soubéiga, S. T., Ouattara, A. K., Zohoncon, T., Djigma, F., Langendorf, C., Simporé, J., 2017.
21 Quinolone resistance (qnr) genes in fecal carriage of extended spectrum beta-lactamases
22 producing enterobacteria isolated from children in Niger. **Current Research in Microbiology**
23 **and Biotechnology**, v. 5, p. 953-957.
- 24
- 25 Neves, G. B., Stefani, L. M., Pick, E., Araujo, D. N., Giuriatti, J., Percio, C., Brisola, M. C.,
26 2016. *Salmonella* Heidelberg isolated from poultry shows a novel resistance profile. **Acta**
27 **Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-6.
- 28
- 29 Osinska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Niestępski, S., 2017. The prevalence and
30 characterization of antibiotic-resistant and virulent *Escherichia coli* strains in the municipal
31 wastewater system and their environmental fate. **Science of the Total Environment**, v. 577, p.

- 1 367-375.
- 2
- 3 Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. C., 2005. Microbiologia veterinária e
4 doença infecciosas. In: Weiss LHN, Weiss RDM. Porto Alegre: **Artmed**, p. 12.
- 5
- 6 Randall, L. P., Lemma, F., Rogers, J. P., Cheney, T. E., Powell, L. F., Teale, C. J., 2014.
7 Prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from pigs at
8 slaughter in the UK in 2013. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 2947–2950.
- 9
- 10 Rochelle-Newall, E., Nguyen, T. M., Sengtaheuanghoung, O., Ribolzi, O., 2015. A short review
11 of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: knowledge gaps and future
12 directions. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 308.
- 13
- 14 Romer, A., Wieler, L. H., Schierack, P., 2012. Analyses of intestinal commensal *Escherichia coli*
15 strains from wild boars suggest adaptation to conventional pig production conditions. **Veterinary**
16 **Microbiology**, v. 161 p. 122-129.
- 17
- 18 Satake, F. M., Assunção, A. W. A., Lopes, L.L. G., Amaral, L. A., 2012. Qualidade da água em
19 propriedades rurais situadas na bacia hidrográfica do córrego rico, Jaboticabal, SP. **ARS**
20 **Veterinária**, Jaboticabal, SP, v.28, n.1, p. 48-55.
- 21
- 22 Silva, K. C. da; Lincopan, N., 2012. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in
23 Brazil: clinical impact and implications for agribusiness. **Jornal Brasileiro de Patologia e**
24 **Medicina Laboratorial**, v. 48, p. 91-99.
- 25
- 26 Silva, C., Oliveira, A., Bezerra, P., Evangelista, J., 2015. *Escherichia coli* na suinocultura.
27 Aspectos clínicos. Uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, p. 123-
28 131.
- 29
- 30 Singh, P., Mustapha, A., 2013. Multiplex TaqMan detection of pathogenic and multi-drug
31 resistant *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, p. 213-218.

- 1
2 Sobestiansky, J., Barcellos, F., 2001. Clínica veterinária em sistemas intensivos de produção de
3 suínos e relatos de casos clínicos. **Goiás**:[s.n.]. p.1543.
4
5 Strauch, D., 1991. Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and
6 sewage sludge. **Veterinary Science Technology**, v. 10, p. 813-846.
7
8 Yeh, J. C., Lo, D. Y., Chang, S. K., Chou, C. C., Kuo, H. C., 2017. Prevalence of plasmid-
9 mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from diseased animals in Taiwan.
10 **Journal of Veterinay Medical Science**, v. 79, p, 730-735.
11
12 Yue, L., Jiang, H. X., Liao, X. P., Liu, J. H., Li, S. J., Chen, X. Y., Chen, C. X., Lu, D. H., Liu,
13 Y. H., 2008. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine
14 clinical isolates os *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 132, p. 414-420, 2008.
15
16 World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: global report os surveillance 2014.
17 Geneva, Switzerland: **WHO**.
18
19 Xiong, W., Sun, Y., Ding, X., Zhang, Y., Zhong, X., Liang, W., Zeng, Z., 2015. Responses of
20 plasmid-mediated quinolone resistance genes and bacterial taxa to (fluoro)quinolones-containing
21 manure in arable soil. **Chemosphere**, v. 119, p. 473-478.
22
23 Xu, G., Na, W., Wang, H., Zhang, X., 2015. Prevalence and characteristics of extended-spectrum
24 Beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with post-weaning diarrhea in
25 Heilongjiang province, China. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p. 1-9.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A região Oeste do Estado de Santa Catarina é uma importante produtora de carne suína, onde, além de atender o mercado interno, exporta para diversos países. Mas a alta produção animal nessa região, associada à falta de tratamento correto de efluentes, trás riscos à saúde pública. Este estudo foi capaz de demonstrar consideráveis índices de contaminação ambiental pela *E. coli*, além de detectar elevados percentuais de resistência aos antimicrobianos nas amostras de origem animal (fezes) e nas de origem ambiental (água e solo), aumentando ainda mais os riscos de disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos.

Neste estudo foi possível detectar genes que conferem resistência às quinolonas, fluoroquinolonas e cefalosporinas de última geração. Estes antimicrobianos são de amplo espectro e fundamentais para o tratamento de enfermidades em humanos e animais, sendo que a disseminação destes genes pode ocorrer principalmente através do meio ambiente.

A positividade para genes de resistência em *E. coli* detectados nas fezes animais e no meio ambiente, traz a possibilidade de transmissão da resistência para outros microrganismos patogênicos e de importância crítica, pois, através de elementos móveis como plasmídeos, íntegrans e transposons, estes genes podem ser transferidos com extrema facilidade entre cepas bacterianas.

Assim, com os resultados descritos neste trabalho, podemos concluir que o uso correto de agentes antimicrobianos e o tratamento adequado de dejetos e efluentes industriais e humanos são de fundamental importância para evitar a disseminação de genes de resistência, evitando problemas com o surgimento de superbactérias.

4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v.146, p.837, 1940.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Resumo do setor de suínos. **Disponível em:** <http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/resumo>. Acesso em 23 de outubro de 2017.

AMBLER, R. P. The Structure of beta-Lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, p. 321-331, 1980.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico. **Brasil**, 2007.

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Potencial de transmissão de enfermidades pela carne, leite e derivados de caprinos e ovinos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.1, p.37-43, 2007.

BAJAJ, P. et al. *Escherichia coli* beta-lactamases: what really matters. **Frontiers in Microbiology**, n 7, p. 1-14, 2016.

BAPTISTA, M. G. F. M. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. Dissertação (Mestrado) - **Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia**, Lisboa, 2013.

BEAN, D. C. et al. Resistance among *Escherichia coli* to sulphonamides and other antimicrobials now little used in man. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 56, p. 962–96, 2005.

BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 347-357, 2008.

BERTSCHINGER, H.U.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli* infections. In: STRAW, B.E.; D'ALLAIRE S.; MENGELING W.L.; TAYLOR, D.J. (Eds.). **Diseases of Swine**. Iowa State University Press, Ames. 1999.

BLONDEAU, J. M. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. **Survey of Ophthalmology**, v.49, p.73-78, 2004.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21 st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p.933-951, 2001.

BRASIL. Instrução Normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016. Diário Oficial da União, 2016.

BRUCE, K.; HICKS, R. W. Perioperative pharmacology: pharmacotherapeutics, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. **AORN Journal**, v.93, p. 259-269, 2011.

BURROW, E. et al. Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli* – A systematic review. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, p. 364-375, 2014.

CALDORIN, M. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.10, p. 4-20, 2013.

CAMARGO, L. R. P.; SUFFREDINI, I. B. Impacto causado por *Escherichia coli* na produção de animais de corte no Brasil: revisão de literatura. **Journal of the Health Sciences Institute**, v.33, p.193-197, 2015.

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

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

CARDOSO, A. L. S. P. et al. Avaliação do perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isolada de aves comerciais. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.12, p. 3980-3988, 2015.

CHEN, X. et al. Prevalence of qnr, aac(6')-Ib-cr, qxA and oqxAB in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 3423-3427, 2012.

CIDASC – Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina. Boletim Agropecuário traz panorama da produção de carnes em Santa Catarina. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2017/03/24/boletim-agropecuário-traz-panorama-da-produção-de-carnes-em-santa-catarina/>. Acesso em: 23 de outubro de 2017.

CHRISTOU, A. et al. The potential implications of reclaimed wastewater reuse for irrigation on the agricultural environment: The knowns and unknowns of the fate of antibiotics and antibiotic resistant bacteria and resistance genes – A review. **Water Research**, v. 123, p. 448-467, 2017.

DOHMEN, M. J. M. et al. Carriage of extended-spectrum beta-lactamases in pigs farmers is associated with occurrence in pigs. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, p. 917-923, 2015.

DRAKER, K. A.; WRIGHT, G.D. Molecular mechanism of the enterococcal aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase': role of GNAT-conserved residues in the chemistry of antibiotic inactivation. **Biochemistry**, v. 43, p. 446–45, 2004.

EDMUNDS, M. W.; MAYHEW, M.S. Pharmacology for the primary care provider. **St Louis, MO: Mosby Elsevier**, 2009.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Suinocultura e meio ambiente em Santa Catarina: Indicadores de desempenho e avaliação sócio-econômica. Concórdia, 2009.

EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Síntese anual da agricultura de Santa Catarina, p. 2013-2014, 2014.

FANG, L. X. Dissemination of the chromosomally encoded CMY-2 cephalosporinase gene in *Escherichia coli* isolated from animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, p. 209-213, 2015.

FERNANDES, M. R. et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene. **Euro Surveill**, v. 21, p. 1-6, 2016.

FEWTRELL, L.; KAY, D. Recreational water and infection: a review of recent findings. **Current Environmental Health Reports**, v.2, p. 85-94, 2015.

HAMMERUM, A. M. Detection of *sul1*, *sul2* and *sul3* in sulphonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 235-237, 2006.

HAMMERUM, A. M.; HEUER, O. E. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 916–21, 2009.

HARADA, S.; ISHII, Y.; YAMAGUCHI, K.; Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. **The Korean Journal of Laboratory Medicine**, v. 28, p. 401-412, 2008.

HEGDE, S. S. et al. Overexpression and mechanistic analysis of chromosomally encoded aminoglycoside 2-N-acetyltransferase (AAC(2)-Ic) from *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 49, p. 876–881, 2001.

JACOBY, G. A.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D. C. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiology Spectrum**, v.2, p. 1-24, 2014.

JANA, S.; DEB, J. K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 140–150, 2006.

JANG, J. et al. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications - a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, p. 570-581, 2017.

KAO, C.Y. et al. First characterization of fluoroquinolone resistance mechanisms in CTX-M-producing *Escherichia coli* from Mongolia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 38, p. 79–81, 2016.

KLEVENS, R. M. et al. For the active bacterial core surveillance (ABCs) MRSA investigators. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **The Journal of the American Medical Association**, v. 298, p. 1763–1771, 2007.

KONG, K. F. et al. Beta-lactam antibiotics: from antibiotics to resistance and bacteriology. **National Institute of Health**, v. 118, p. 1–36, 2010.

LAMBERT, M. L. et al. Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, p. 30–38, 2011.

LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance - the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, p. 1057-98, 2013.

LIU, Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, p. 161-168, 2015.

MACCARI, A. P., et al. Ecotoxicological effects of pigs manure on *Folsomia candida* in subtropical Brazilian soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 15, 2016.

MARTÍNEZ, J. M. R. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: two decades on. **Drug Resistance Updates**, v. 29, p. 13–29, 2016.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A.; JACOBY, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **Lancet**. v. 351, p. 797-799, 1998.

MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nature**, v. 4, p. 608-620, 2006.

MENDES, C. A. C.; BURDMANN, E. Polimixinas - revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, p. 752-9, 2009.

MENG, J. et al. Pathogenic *Escherichia coli*. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. **4th ed.** Washington: APHA. p. 331-341. 2001.

MOJICA, E. R.; AGA, D. S. Antibiotics pollution in soil and water: potential ecological and human health issues. **Encyclopedia of Environmental Health**, p. 97-110, 2011.

MORA, A. et al. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin) producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 793-806, 2005.

MOUMONI, A. et al. Quinolone resistance (qnr) genes in fecal carriage of extended spectrum beta-lactamases producing *Enterobacteria* isolated from children in Niger. **Current Research in Microbiology and Biotechnology**, v. 5, p. 953-957, 2017.

NEILL, A. J. et al. Using spatial-stream-network models and long-term data to understand and predict dynamics of faecal contamination in a mixed land-use catchment. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 840-852, 2018.

NESPOLO, N. M., et al. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and O26 sorbitol negative in a cattle slaughterhouse and susceptibility to antimicrobials. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, 2014.

OLIVEIRA, A. L. Análise da presença de genes do sistema de secreção tipo 6 em cepas de *Escherichia coli* patogênicas aviárias (APEC) isoladas de colisepticemia em frangos de corte do Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado) - **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre - RS, 2011.

OVERDEVEST, I. et al. Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli*. In: chicken meat and humans, the netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1216-22, 2011.

PESSANHA, R. P.; FILHO, P. P. G. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de *Enterobacteriaceae* lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 34-42, 2001.

POIREL, L. et al. Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 16, p. 281, 2016.

PUPO, M. T. et al. Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry: Taft, C. A. **Research Signpost**: Kerala, 2006.

QUINN, P. J. et al. Microbiologia veterinária e doença infecciosas. In: Weiss LHN, Weiss RDM. Porto Alegre: **Artmed**, p. 512, 2005.

REDGRAVE, L.S. et al. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends Microbiology**, v. 22, p. 438–445, 2014.

ROCHELLE-NEWALL, E. et al. A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: knowledge gaps and future directions. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 308, 2015.

ROWE-MAGNUS, D. A.; MAZEL, D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, p. 115–125, 2002.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal Infectious Diseases**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

SCHROEDER, C. M. et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 576–581, 2002.

SHIN, S. W. et al. Prevalence of antimicrobial resistance and transfer of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolates from beef cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 5560-5566, 2015.

SILVA, K. C. da; LINCOPAN, N. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: clinical impact and implications for agribusiness. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, p. 91-99, 2012.

SILVA, C. et al. *Escherichia coli* na suinocultura. Aspectos clínicos. Uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, p. 123-131, 2015.

SINGER, R. S. et al. Antibiotic resistance: the interplay between antibiotic use in animals and human beings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, p. 47-51, 2003.

SOUZA, N. C. C. DE. Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de *Escherichia coli* em água. Dissertação (Mestrado) – **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2010.

SPINOSA, H. S. Antibióticos: aminoglicosídeos, polimixinas, bacitracina e vancomicina. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 4 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2006.

STORM, D. R. et al. Polymyxin and related peptide antibiotics. **Annual Review Biochemistry**, v. 46, p. 723-63, 1977.

STOKES, H. W.; HALL, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding sitespecific gene-integration functions: integrons. **Molecular Microbiology**, v. 3, p. 1669–1683, 1989.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, v, 34, p. S3-10, 2006.

VAN DAMME, I. et al. High abundance and diversity of extend-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* in faeces and tonsils of pigs at slaughter. **Veterinary Microbiology**, v. 208, p. 190-194, 2017.

VON SALVIATI, C. et al. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in German fattening pig farms: a longitudinal study. **Berliner Und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v. 127, p. 412-419, 2014.

WOODFORD, N. et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae* from animal and the environment: an emerging public health risk of our own making. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 69, p. 287-91, 2014.

WOLFSON, J. S.; HOOPER, D. C. Fluoroquinolone antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, p. 378-424, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global strategy for food safety: safer food for better health. Geneva:Switzerland: **WHO**, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Critically important antimicrobials for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to nonhuman antimicrobial use. Geneva: Switzerland: **WHO**, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva, Switzerland: **WHO**, 2014.

WU, S. et al. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.52, p. 1-7, 2010.

XU, L. et al. Regional survey of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* reveals marked heterogeneity in the distribution of the ST131 clone. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 66, p.505–11, 2011.

YANG, J. et al. Diverse prevalence of 16S rRNA methylase genes *armA* and *rmtB* amongst clinical multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 348-351, 2011.