

Juliana Tiemi Takahashi

**Detecção e Identificação de Beta-lactamases de
Espectro Estendido e de Genes de Resistência às
Quinolonas em Enterobacteriaceae Isoladas de
Amostras de Carnes de Frango, Suína e Bovina
Destinadas ao Consumo Humano**

**São José do Rio Preto
2015**

Juliana Tiemi Takahashi

Detecção e Identificação de Beta-lactamases de
Espectro Estendido e de Genes de Resistência às
Quinolonas em Enterobacteriaceae Isoladas de
Amostras de Carnes de Frango, Suína e Bovina
Destinadas ao Consumo Humano

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Curso de
Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo
Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Corrêa Lelles Nogueira

São José do Rio Preto
2015

Takahashi, Juliana Tiemi

Detecção e identificação de beta-lactamases de espectro estendido e de genes de resistência às quinolonas em Enterobacteriaceae isoladas de amostras de carnes de frango, suína e bovina destinadas ao consumo humano / Juliana Tiemi Takahashi

São José do Rio Preto, 2015

112 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Corrêa Lelles Nogueira

1. Beta-lactamase de espectro estendido; 2. *qnr*; 3. *oqxAB*; 4. Carnes; 5. Enterobacteriaceae

JULIANA TIEMI TAKAHASHI

Detecção e identificação de beta-lactamases de espectro estendido e de genes de resistência às quinolonas em Enterobacteriaceae isoladas de amostras de carnes de frango, suína e bovina destinadas ao consumo humano

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Mara Corrêa Lelles Nogueira

2º Examinador: Prof^º. Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe

3º Examinador: Prof^ª. Dr^ª. Milena Polotto

Suplentes: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Modesto Tollentino

Prof^ª. Dr^ª. Margarete Teresa Gottardo de Almeida

São José do Rio Preto, 23/11/2015.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS E QUADROS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE SÍMBOLOS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. A importância da família Enterobacteriaceae	4
2.2. A importância da resistência aos beta-lactâmicos e quinolonas em Enterobacteriaceae e os principais mecanismos de resistência	6
2.3. Resistência aos beta-lactâmicos	7
2.4. Resistências às quinolonas	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Isolamento, identificação e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas do estudo	12
3.2. Estudos moleculares	16
3.2.1. Extração do DNA genômico	16
3.2.2. Detecção do ESBL por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	17
3.2.3. Detecção do gene <i>qnr</i> por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	19
3.2.4. Multiplex-PCR	21
3.2.5. Purificação dos “amplicons”	22
3.2.6. Agrupamento dos genes <i>bla</i> _{CTX-M} por RFLP	23
3.2.7. Confirmação da identificação de <i>Salmonella</i> spp. através da técnica de PCR em Tempo Real (qPCR)	24
3.2.8. Sequenciamento dos genes <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> e <i>qnrB</i>	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Detecção de <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> nas amostras de carnes de frango, suína e bovina	28
4.2. Suscetibilidade aos antimicrobianos	34

4.2.1. Isolamento bacteriano	34
4.2.2. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos	36
4.3. Detecção de genes responsáveis pela resistência aos beta-lactâmicos e às quinolonas.....	42
4.3.1. Genes de resistência aos β -lactâmicos	42
4.3.1.1. Detecção e caracterização de <i>bla</i> _{SHV}	42
4.3.1.2. Detecção e caracterização de <i>bla</i> _{TEM}	48
4.3.1.3. Detecção e caracterização de <i>bla</i> _{CTX-M}	51
4.3.2. Genes de resistência às quinolonas	57
4.3.2.1. Genes <i>qnrB</i>	57
4.3.2.2. Genes <i>qnrS</i> e <i>qnrA</i>	61
4.3.2.3. Genes <i>oqxAB</i>	62
5. CONCLUSÃO	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXO 1	100

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por permitir vivenciar cada momento, dando-me forças para seguir em frente sempre.

Aos meus pais, Hiroko Sakamoto e Augusto Kiyoshi Takahashi, pelo apoio em todos os momentos da minha vida e por me proporcionarem este caminho desde minha infância até esta etapa.

Aos meus irmãos, Leonardo Sakamoto Vieira e Rodrigo Hideki Takahashi e aos meus familiares que me ajudaram e sempre estiveram ao meu lado em todas as minhas decisões.

Ao Rafael Tiago Brazolin, pelo carinho, por todo amor, apoio, pela compreensão e segurança em cada instante que necessitei.

Aos meus amigos, André Martins Pólo, André Luis Giacometti Conceição, Bruna Stuqui, Camila Keila Magno Leonel, Paulo Roberto de Barros Júnior e Rafael Monteiro de Oliveira por toda ajuda e incentivo, desde a faculdade até a conclusão desta etapa, não apenas na vida acadêmica, mas também na minha vida pessoal.

À Profa. Dra. Mara Corrêa Lelles Nogueira, por me receber muito bem, pelos ensinamentos, preocupação, dedicação e por acreditar em mim para a realização deste trabalho.

Ao Tiago Casella, pela paciência e dedicação em todos os ensinamentos desde a minha iniciação científica realizada na FAMERP.

Às minhas amigas, Evelin Rodrigues Martins, Luciângela de Oliveira Pereira, Máira Gazzola Arroyo, Maisa Guimarães Sartim e Simone Quintão, pelo companheirismo, por toda a colaboração e dedicação em várias etapas deste estudo.

Ao Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira, pela colaboração e disposição em ceder o *Laboratório de Pesquisa em Virologia* e materiais para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida, pela colaboração e disposição em ceder o *Laboratório de Microbiologia* e materiais para a realização deste trabalho.

Aos professores de graduação e pós-graduação, que com todo conhecimento, me proporcionaram o aprendizado.

À Milena Polotto e à Tatiana Elias Colombo, por toda a contribuição na etapa de sequenciamento deste projeto.

Ao grupo de pesquisa, composto pela Evelin, Fernanda, Luciângela, Mayra, Milena, Naiady, Simone e pelo Tiago, por toda a colaboração, ensinamentos e compreensão.

Aos colegas da FAMERP, Alessandra, Ana Carolina, Ana Thereza, Carolina, Daiane, Danila, Eliane, Gislaine, Guilherme, Kátia, Luana, Luceli, Maisa, Milene, Tatiana e Tauyne, pela ajuda e companhia durante todo o andamento deste projeto.

Aos membros da banca examinadora, pela disposição em aceitar o convite e contribuir para este trabalho com seus ensinamentos.

Aos funcionários da FAMERP, pela paciência, competência e dedicação em proporcionar condições necessárias para o bom andamento deste trabalho.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP, por contribuir para minha formação.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, por proporcionar a continuidade do meu aprendizado e pelo espaço cedido para a execução deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço, com muita sinceridade, cada pessoa citada acima. Tenho muito respeito, admiração e carinho por todos. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características bioquímicas das cepas isoladas em ágar no estudo.	29
Figura 2. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, observado entre as Enterobacteriaceae isoladas de CRS.....	37
Figura 3. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos observado entre as Enterobacteriaceae isoladas de CRF.....	39
Figura 4. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos observado entre Enterobacteriaceae isoladas de CRB.	40
Figura 5. Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene <i>bla</i> _{SHV}	44
Figura 6. Gel de eletroforese da multiplex-PCR para detecção dos genes <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{CTX-M}	44
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à PCR para detecção do gene <i>bla</i> _{SHV}	45
Figura 8. Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene <i>bla</i> _{TEM}	49
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à PCR para detecção do gene <i>bla</i> _{TEM}	50
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à reação de PCR para detecção do gene <i>bla</i> _{CTX-M}	52
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à reação de PCR para detecção do gene <i>bla</i> _{CTX-M}	53
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 2% referente aos produtos da técnica de RFLP para detecção do grupo do gene <i>bla</i> _{CTX-M} nas cepas indicadas.	53
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 2% referente à reação de PCR para detecção do gene <i>qnr</i>	58
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 2% referente à reação de PCR para detecção do gene <i>qnr</i>	58
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 2% referente à reação de PCR para detecção do gene <i>qnr</i>	59
Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 2% referente à reação de PCR para detecção do gene <i>qnr</i>	62
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à PCR para detecção do gene <i>oqxAB</i>	63

Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à PCR para detecção do gene <i>oqxAB</i>	63
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à PCR para detecção do gene <i>oqxAB</i>	64
Figura 20. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à PCR para detecção do gene <i>oqxAB</i>	64

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. <i>Primers</i> utilizados nas PCR de detecção e ERIC-PCR.	18
Quadro 2. <i>Primers</i> usados para a detecção e sequenciamento de genes de resistência às quinolonas.	21
Quadro 3. Padrões de restrição gerados pelas endonucleases nos genes codificadores de CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-8.	23
Tabela 1. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, fonte de isolamento e identificação das cepas que apresentaram genes de resistência.	31
Tabela 1 (continuação). Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, fonte de isolamento e identificação das cepas que apresentaram genes de resistência.	32
Tabela 1 (continuação). Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, fonte de isolamento e identificação das cepas que apresentaram genes de resistência.	33
Tabela 2. Bactérias resistentes à cefalosporinas de terceira geração e às quinolonas em CRS, CRF e CRB.	36
Tabela 3. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene <i>bla_{SHV}</i>	47
Tabela 3. (continuação). Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene <i>bla_{SHV}</i>	48
Tabela 4. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene <i>bla_{TEM}</i>	51
Tabela 5. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene <i>bla_{CTX-M}</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS

- AK – amicacina
AMC – amoxicilina/ácido clavulânico
ATCC – “American Type Culture Collection”
ATM – aztreonam
C – cloranfenicol
CAZ – ceftazidima
CIP – ciprofloxacina
CLSI – “Clinical Laboratory Standards Institute”
CN – gentamicina
CRB – carne resfriada bovina
CRF – carne resfriada de frango
CRO – ceftriaxona
CRS – carne resfriada suína
CTX – cefotaxima
DNA – ácido desoxirribonucleico
dNTP – “Desoxynucleoside Triphosphate”
EFT – ceftiofur
ENO – enrofloxacin
ETP – ertapenem
FEP – cefepima
FOS – fosfomicina
FOX – cefoxitina
IPM – imipenem
KF – cefalotina
LEV – levofloxacin
MXF – moxifloxacin
NA - ácido nalidixico
OFX – ofloxacin
PCR – “Polymerase Chain Reaction”
q.s.p. – quantidade suficiente para

RFLP - “Restriction Fragment Length Polymorphism”

SAM – ampicilina/sulbactam

TE – tetraciclina

TOB – tobramicina

TZP – piperacilina/tazobactam

LISTA DE SÍMBOLOS

G – força gravitacional

g – gramas

°C – graus Celsius

kb – kilobases

µg – microgramas

µL – microlitros

mL – mililitros

pb – pares de base

pmol – picomol

rpm – rotações por minuto

U – unidade

V/cm – voltagem total dividida pela distância, em centímetros, entre os eletrodos

X – quantidade de vezes que uma solução está concentrada em relação à concentração final

RESUMO

Introdução: A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um importante problema de saúde pública, que prolonga o período de tratamento, aumenta as taxas de mortalidade e custos da assistência à saúde. Este fenômeno pode ter considerado consequência do uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária, e ao longo da cadeia produtiva de alimentos. Nos últimos anos tem sido observado o frequente isolamento de bactérias resistentes a partir de animais de produção e alimentos de origem animal. Neste contexto, têm-se destacado a resistência aos beta-lactâmicos, devido à produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) e às quinolonas pela aquisição de genes *qnr* que codificam proteínas que interferem na ação das quinolonas sobre a DNA-girase e a topoisomerase IV. Diversas espécies bacterianas apresentando resistência aos antimicrobianos têm sido isoladas a partir de animais de produção.

Objetivo: Este estudo teve como objetivo isolar enterobactérias resistentes aos beta-lactâmicos e quinolonas e detectar os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *oqxAB* em Enterobacteriaceae resistentes isoladas de carnes resfriadas de frango, suína e bovina comercializadas no município de São José do Rio Preto-SP, adquiridas entre novembro de 2010 e agosto de 2012. **Material e Métodos:** A suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinada por disco-difusão de acordo com as normas do CLSI. As cepas resistentes aos beta-lactâmicos e às quinolonas foram submetidas à PCR com *primers* específicos para a detecção destes genes e ao sequenciamento para a identificação dos mesmos. **Resultados:** Um total de 75 isolados apresentou resistência aos beta-lactâmicos e 125 às quinolonas. Entre estes, 6,6% *bla*_{CTX-M}, 6,6% *bla*_{TEM}, 16% *bla*_{SHV}, 21,6% apresentaram variantes de *qnr* e 13,6% *oqxAB*. Em uma cepa de

Aeromonas sobria foi detectada a coexistência dos genes *qnrA* e *qnrS*; o gene *qnrB* foi detectado em cinco cepas de *E. coli*, cinco *K.pneumoniae*, duas *Salmonella* spp. e 12 *Citrobacter* spp. O gene *qnrB19* foi detectado em duas *K. pneumoniae*, duas *E. coli* e uma *Citrobacter braakii*. *qnrB2* foi detectado em três *K. pneumoniae*. O gene *qnrS1* foi detectado em uma cepa de *K. pneumoniae*. O sequenciamento de *bla*_{CTX-M} revelou *bla*_{CTX-M-2}, sendo que todas foram provenientes de amostras de carne de frango.

Conclusão: Esses dados revelam que pode haver associação entre o excessivo uso de antimicrobianos em animais de produção e o isolamento de bactérias resistentes aos mesmos. A presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos em carnes destinadas ao consumo humano consiste em um problema de saúde pública e pode afetar as relações comerciais do país, já que o Brasil é um dos maiores exportadores de carne do mundo.

Palavras-chave: Beta-lactamase de espectro estendido, *qnr*; *oqxAB*; Carnes; Enterobacteriaceae.

ABSTRACT

Introduction: Bacterial resistance to antimicrobials is an important public health problem, which results in increased treatment period, increase in mortality and in health care costs. This phenomenon is considered a result of the indiscriminate use of antimicrobials in human and veterinary medicine, and along the food chain. In recent years, it has been observed the frequent isolation of resistant bacteria from animal production and food of animal origin. In this context, have been highlighted the resistance to beta-lactâmicos and to quinolones, the first, due to extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production and the second, resultant from the acquisition of *qnr* genes encoding proteins that interfere in quinolone action on DNA gyrase and topoisomerase IV. Several bacterial species with antimicrobial resistance have been isolated from farm animals. **Objective:** This study evaluated the antimicrobial susceptibility profile and the presence of resistance genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *oqxAB* in Enterobacteriaceae isolated from meat market in the municipality of São José do Rio Preto- SP, acquired between November 2010 and August 2012. **Material and Methods:** The antimicrobial susceptibility was determined by disk diffusion according to CLSI. Strains resistant to beta-lactams and quinolones were submitted to PCR using specific primers for detection and sequencing of these genes for identification. **Results:** A total of 75 isolates were resistant to beta-lactam and 125 to quinolones. Among these, 6.6% *bla*_{CTX-M}, 6.6% *bla*_{TEM}, 16% *bla*_{SHV}, 21.6% had *qnr* variants and 13.6% *oqxAB*. In a strain of *Aeromonas sobria* was detected the coexistence of *qnrA* and *qnrS* genes; the *qnrB* gene was detected in five strains of *E. coli*, five *K.pneumoniae*, two *Salmonella* spp. and 12 *Citrobacter* spp. The *qnrB19* gene

was detected in two *K. pneumoniae*, duas *E. coli* and one *Citrobacter braakii*. *qnrB2* was detected in three *K. pneumoniae*. The *qnrS1* gene was detected in a strain of *K. pneumoniae*. The sequencing *bla*_{CTX-M} revealed *bla*_{CTX-M-2}, all of which were derived from chicken meat samples. **Conclusion:** These data demonstrate there may be association between excessive use of antimicrobials in animal production and isolation of bacteria resistant to these antimicrobials. The presence of bacteria resistant to antimicrobials in meat intended for human consumption consists in a public health problem and can affect commercials relationships of the country, since it the Brazil is one of the world's largest meat exporters.

Keywords: extended-spectrum β -lactamase; *qnr*; *oqxAB*; Meat samples; Enterobacteriaceae.

1. INTRODUÇÃO

As infecções causadas por bactérias resistentes são um importante desafio para a medicina, devido à limitação das opções terapêuticas que resultam em aumento dos períodos de internação hospitalar, das taxas de mortalidade e dos custos da assistência à saúde. Assim, a resistência aos antimicrobianos é considerada atualmente um dos principais problemas de saúde pública, em todo o mundo.^(75,135,165)

Neste contexto, destacam-se patógenos da família Enterobacteriaceae, causadores de uma ampla diversidade de infecções, que acometem tanto o trato gastrointestinal (TGI) como diferentes sítios corpóreos (infecções extraintestinais). A família Enterobacteriaceae é a maior e mais heterogênea entre as bactérias Gram-negativas de importância clínica,^(10,38) e a rápida evolução da resistência tem sido observada com crescente frequência entre as suas principais espécies patogênicas.^(135,165,182,183)

Assim como ocorre o crescimento de Enterobacteriaceae resistentes aos antimicrobianos em saúde pública, seu isolamento a partir de animais de produção e carnes tem sido amplamente relatado. Esta realidade é considerada consequência da seleção de cepas resistentes no trato gastrointestinal (TGI) de animais de produção, devido ao intenso uso de antimicrobianos na medicina veterinária e no manejo de animais, para tratamento de diversas doenças infecciosas e profilaxia contra a diarreia.^(1,16,17,140) Assim, aves, suínos e bovinos tornam-se um importante reservatório de bactérias resistentes, e de genes de resistência.^(6,21,34,62,140,141,163,166)

Durante o abate e processamento, o conteúdo do TGI de animais de produção pode contaminar a carcaça, resultando na produção de carnes que poderão ser fonte de bactérias resistentes para o homem. Após a transmissão via cadeia alimentar, estas

bactérias podem colonizar o intestino e posteriormente causar infecções,^(115,164) ou atuar como doadores de genes de resistência que são transferidos por conjugação através de elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons para bactérias da microbiota intestinal humana.^(20,96) Nos últimos anos, a transmissão de bactérias resistentes a várias classes de antimicrobianos para o homem através da cadeia alimentar tem sido amplamente relatada.^(18,21,25,35,40,42,57,66,95,97,113,114,122,156,181,187) Em resposta, o desenvolvimento de programas de monitoramento em bactérias presentes em animais de produção tem sido estimulado,^(5,52,126) visando, entre outros objetivos, gerar conhecimento sobre a gênese e fluxo de genes de resistência entre comunidades microbianas, incluindo o papel de micro-organismos comensais como reservatórios da resistência, e o conhecimento sobre a transferência da resistência entre humanos, animais e plantas.⁽⁵⁰⁾ Em diversos países, tais programas foram instituídos, como estratégia para a prevenção e controle da disseminação da resistência.⁽⁷⁰⁾

Para o Brasil, a realização deste monitoramento é importante por questões de saúde pública (as carnes apresentam características intrínsecas ideais para a multiplicação bacteriana, e são os principais alimentos responsáveis pela veiculação de patógenos ao homem) e comerciais (o país é o maior exportador mundial de carne bovina e de aves, o 4º maior exportador de carne suína,⁽¹²⁾ e apresenta um consumo doméstico de carnes que está entre os maiores do mundo e permanece em constante crescimento).^(76,150) Entretanto, ainda são poucos os estudos de investigação da resistência em bactérias provenientes da produção animal no país, apesar das recomendações internacionais e da sua importância para avaliações de risco e para o comércio internacional de produtos alimentares.^(134,160)

O objetivo deste trabalho é conhecer o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em diferentes espécies de Enterobacteriaceae isoladas de amostras de carnes de aves, bovina e suína comercializadas para consumo humano. Identificar os genes responsáveis pela resistência aos beta-lactâmicos, como *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} e quinolonas, como *qnr* e *oqxAB* nestas diferentes espécies de Enterobacteriaceae isoladas das amostras de carnes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A importância da família Enterobacteriaceae

A família Enterobacteriaceae é a maior e mais heterogênea entre as bactérias Gram-negativas de importância clínica. Diversas de suas espécies estão associadas a uma ampla variedade de síndromes infecciosas, que acometem tanto o trato gastrointestinal (TGI) como diferentes sítios corpóreos (infecções extraintestinais).^(10,38)

Entre todas as Enterobacteriaceae encontradas no TGI de humanos e de animais, *E. coli* é a espécie predominante. Vários sorotipos são comensais,^(41,49) mas alguns apresentam fatores de virulência que os tornam capazes de causar doenças do TGI (diarreiogênicos) e extra-intestinais.⁽⁸⁸⁾ Entre as que causam infecções do TGI destacam-se as enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasoras (EIEC), enteroagregativas (EAggEC), com padrão de aderência difuso (DAEC) e enterohemorrágicas (EHEC). Vários sorotipos são adquiridos através do consumo de alimentos contaminados, inclusive carnes de frango, bovina e suína.^(56,100,142)

Surtos de infecção do TGI por *E. coli* veiculadas por alimentos são particularmente associados a cepas EHEC, e com menor frequência a cepas de EPEC, ETEC e EaggEC.^(88,124) O principal reservatório de EHEC é o TGI de bovinos. Atualmente são conhecidos relatos de surtos relacionados a diversos tipos de alimentos.⁽⁸⁸⁾

Além disso, sorotipos de *E. coli* uropatogênicas (UPEC) resistentes a antimicrobianos foram isoladas a partir de carnes de frango e suína, e a ocorrência de infecções do trato urinário por UPEC adquiridas através da alimentação tem sido relatada.^(81,111) A presença de *E. coli* em alimentos também indica falhas na higiene e

presença de contaminação de origem fecal, e elevadas contagens podem indicar a contaminação por níveis significativos de outros enteropatógenos, como *Salmonella* spp.^(44,61,83)

O gênero *Salmonella* consiste de duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* inclui seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*). Em 2004 foi proposta a inclusão de uma terceira espécie, denominada *S. subterranea*.^(139,157) Nos últimos anos, *Salmonella enterica* tem emergido como o mais importante agente causador de salmonelose em todo o mundo, sendo que existem 1427 sorotipos causadores de infecções cuja gravidade varia de gastroenterite até doença disseminada grave, sendo uma importante causa de hospitalização e mortalidade.^(4,57,153,176) As gastroenterites são as manifestações mais comuns da infecção, e caracterizam-se como um quadro de diarreia, cólicas abdominais e febre. A febre entérica, denominação geral para as febres tifoide e paratifoide, é a forma disseminada e mais agressiva de salmonelose. São causadas por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhi (*Salmonella* Typhi) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Paratyphi (*Salmonella* Paratyphi) respectivamente.

Os alimentos de origem animal são os principais veículos para *Salmonella enterica* sendo que a frequência de detecção em carnes, inclusive de cepas multirresistentes, tem aumentado e se tornado motivo de preocupação.^(42,57,95,97,122,181) Fatores como a globalização da economia, a grande movimentação de alimentos e animais de produção através do mundo e a resistência aos antimicrobianos são descritos como fatores determinantes para esta epidemia.⁽⁵⁸⁾

Além de *E. coli* e *Salmonella*, outras espécies de Enterobacteriaceae podem causar infecções intestinais e/ou extraintestinais, e são reservatórios para genes de

resistência transmitidos horizontalmente para diversas espécies de bactérias patogênicas ou comensais no trato gastrointestinal humano. Entre elas destacam-se *K. pneumoniae*, que é um importante patógeno hospitalar e comunitário, e os gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, que podem causar infecções extraintestinais após translocar-se do TGI para outros sítios corporais.⁽⁸⁷⁾ Estas bactérias têm sido isoladas a partir de amostras de carnes,⁽²²⁾ e a emergência na comunidade nos últimos anos de cepas de *E. coli* e *Klebsiella* spp. uropatogênicas multirresistentes têm estimulado a discussão sobre o papel dos alimentos de origem animal como reservatório para bactérias resistentes causadoras de infecções extraintestinais.^(14,112)

2.2. A importância da resistência aos beta-lactâmicos e quinolonas em Enterobacteriaceae e os principais mecanismos de resistência

Os beta-lactâmicos (principalmente cefalosporinas de espectro estendido, como cefoxitina, cefalotina, cefotaxima, ceftriaxona e ceftiofur e carbapenêmicos, como meropenem, ertapenem e imipenem) e fluoroquinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacina, ofloxacina e moxifloxacina) constituem as principais escolhas terapêuticas para infecções causadas pelas Enterobacteriaceae.⁽³³⁾ Entretanto, a rápida disseminação de cepas resistentes, associada à transmissão horizontal de genes que codificam resistência a estes antimicrobianos, tem tornado o tratamento um desafio, e resultan]do no aumento das taxas de mortalidade e no custo da assistência à saúde. Os principais mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos e às quinolonas em Enterobacteriaceae serão apresentados a seguir.

2.3. Resistência aos beta-lactâmicos

Os beta-lactâmicos compõem um grupo de antimicrobianos criticamente importantes tanto em medicina humana quanto veterinária.^(127,182) Caracterizam-se por possuírem um anel beta-lactâmico ligado a um anel de tiazolidina, e ainda uma cadeia lateral variável.⁽⁵⁵⁾ A integridade do anel beta-lactâmico é imprescindível à sua atividade, que consiste em inibir a síntese da parede celular bacteriana pela inativação das transpeptidases que catalisam ligações cruzadas na fase final de síntese do peptidoglicano. A hidrólise do anel beta-lactâmico implica na inativação dos beta-lactâmicos.⁽¹⁵⁵⁾

A produção de ESBLs é um dos principais mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos.^(118,171) As ESBLs são enzimas da classe A de Ambler e 2be de Bush-Jacoby-Medeiros, que realizam a hidroxilação irreversível da ligação amida do anel beta-lactâmico, impedindo sua ação nas transpeptidases.⁽¹⁵⁾ Inativam penicilinas, quase todas as cefalosporinas e o aztreonam, e são responsáveis por grande parcela de falha dos tratamentos com cefalosporinas de terceira geração.⁽⁶⁵⁾

Diversas famílias de ESBLs (SHV, TEM, CTX-M, SFO, BES, BEL, TLA, GES, PER e VEB) foram descritas, mas atualmente, as do tipo CTX-M são as mais prevalentes e encontram-se mundialmente disseminadas.^(8,72,121,184) A disseminação da ESBL tipo CTX-M é facilitada pela localização dos genes *bla*_{CTX-M} em plasmídeos e associação com elementos genéticos móveis, incluindo sequências de inserção tipo *ISEcp1* e *ISCRI*.^(19,36)

Os tipos de CTX-M são agrupados de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos em cinco grupos distintos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9

e CTX-M-25. O grupo CTX-M-1 inclui as enzimas CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30, -32, -33, -36, -54, -55, -57 e UOE-1. O grupo CTX-M-2 inclui as enzimas CTX-M-2, -4, -7, -20, -31 e -44. O grupo CTX-M-8 inclui as enzimas CTX-M-8, -40 e -63. O Grupo CTX-M-9 inclui as enzimas CTX-M-9, -13, -14, -16 a -19, -21, -27, -45 a -50. O grupo CTX-M-25 inclui CTX-M-25, -26, -39 e -41.^(8,19)

As beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) são as enzimas mais comumente descritas em Enterobacteriaceae isoladas de animais de produção.⁽¹⁶³⁾ As principais ESBLs encontradas em isolados de animais são as mesmas produzidas por patógenos ou comensais humanos, e diversos trabalhos relatam o movimento dos genes de resistência de animais para seres humanos ou vice-versa.^(7,29,45,74)

Em 2006, Riaño e colaboradores⁽¹⁴⁶⁾ isolaram cepas produtoras de CTX-M-9 de carcaças de frango na Espanha, onde CTX-M-9 é também prevalente em isolados humanos. Na França, *Salmonella enterica* sorotipo Virchow produtora de CTX-M-9 foi isolada em animais de produção e posteriormente em uma amostra isolada de fezes de uma criança com gastroenterite.⁽¹⁸⁰⁾ Um estudo realizado por Ensor e colaboradores⁽⁴⁵⁾ demonstrou que peitos de frango pré-preparados importados do Brasil para o Reino Unido continham *E. coli* produtoras de CTX-M-2, uma ESBL comum no Brasil.⁽¹⁷⁴⁾ Além disso, estas cepas eram genotipicamente idênticas às encontradas em humanos na América do Sul. A enzima CTX-M-15, a mais disseminada entre as Enterobacteriaceae isoladas de humanos, foi detectada em *E. coli* isoladas de aves domésticas e suínos.^(162,172) No Brasil, estudo realizado por Peirano e colaboradores⁽¹³¹⁾ para a identificação de genes de resistência em *Salmonella enterica* isoladas de amostras clínicas humanas, animais, ração animal e alimentos, identificou genes que codificam CTX-M-8 e CTX-M-9.

As beta-lactamases do tipo TEM constituem uma importante família de β -lactamases, com grande impacto clínico. TEM-1 foi a primeira variante descrita e nomeada em homenagem a uma menina grega de nome Temoneira, de quem foi isolada.⁽¹²¹⁾

As beta-lactamases do tipo SHV são denominadas em função da sua estrutura química (“sulphydryl variable”).⁽¹²¹⁾ Também são enzimas extremamente disseminadas entre as Enterobacteriaceae, além de serem encontradas em outros bacilos Gram-negativos.⁽¹⁰⁶⁾

As ESBLs do tipo TEM são derivadas de enzimas de espectro restrito TEM-1 e TEM-2, e as do tipo SHV são derivadas de enzimas de espectro restrito SHV-1. TEM-1, TEM-2 e SHV-1 são codificadas por genes tipo *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} localizados no cromossomo bacteriano.^(64,105,130) A ocorrência de mutações pontuais em *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-2} e *bla*_{SHV-1} resultaram em remodelagem do sítio ativo da enzima e expansão de sua atividade hidrolítica.⁽⁷⁸⁾ Ao contrário das ESBLs do tipo CTX-M, as SHV e TEM apresentam maior eficiência hidrolítica sobre a ceftazidima do que sobre a cefotaxima.⁽⁸⁾

SHV-2 foi a primeira ESBL do tipo SHV descrita, identificada em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens*.⁽⁹³⁾ Em 1987, foi descrita TEM-3, a primeira ESBL do tipo TEM, identificada em isolados clínicos de *K. pneumoniae*.⁽¹⁶¹⁾ Atualmente, ESBLs dos tipos TEM e SHV são de ocorrência mundial, inclusive no Brasil.^(8,59,116,118,176) Essas enzimas, codificadas por genes localizados em transposons, se disseminam facilmente através de plasmídeos conjugativos entre diferentes espécies de bactérias,^(67,79,135) e são identificadas em importantes patógenos da família Enterobacteriaceae.⁽⁷³⁾

Além de CTX-M, as ESBLs tipo TEM-52, TEM-126 e SHV-12 foram detectadas em Enterobacteriaceae isoladas de aves produtoras no continente Europeu.^(13,29,71,109,110,146,162) Em 2003, na Espanha, Briñas e colaboradores⁽¹³⁾ isolaram cepas de *E. coli* de amostras fecais de frangos saudáveis que apresentaram os genes *bla*_{TEM-1b} e *bla*_{SHV-12}.

2.4. Resistências às quinolonas

As quinolonas são antimicrobianos criticamente importantes tanto em medicina humana quanto veterinária, utilizados para a profilaxia e tratamento de infecções em humanos e animais.^(27,127,182) Sua ação antimicrobiana é baseada na ligação às enzimas DNA girase e topoisomerase IV, inibindo a replicação do DNA e impedindo o crescimento bacteriano.⁽¹³⁷⁾

Até o presente, mutações em genes cromossômicos que codificam a DNA girase e a topoisomerase IV são considerados os principais mecanismos de resistência às quinolonas em bactérias.⁽¹⁴⁴⁾ Entretanto, a resistência codificada por genes plasmidiais têm importância devido à sua capacidade de disseminação. Entre estes, destacam-se: *i*) a produção de peptídeos da família Qnr (QnrA, QnrB, QnrC, QnrD e QnrS), codificados por variantes dos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*, que atuam através da inibição alostérica da quinolona, impedindo a ligação da droga à topoisomerase IV e à DNA girase. Conferem resistência ao ácido nalidíxico e reduzida suscetibilidade às fluoroquinolonas;⁽¹⁴⁷⁾ *ii*) a produção de uma variante da proteína modificadora de aminoglicosídeos Aac(6')-Ib-cr, uma acetiltransferase codificada pelo gene *aac(6')-Ib-cr*, que confere reduzida suscetibilidade à ciprofloxacina através da alteração da sua

estrutura química;⁽¹⁸⁶⁾ *iii*) a produção das bombas de efluxo QepA, relacionada ao efluxo da norfloxacin e ciprofloxacina,^(136,188) e OqxAB, que realiza o efluxo de múltiplos agentes, incluindo fluoroquinolonas.^(92,168)

Em 1994, foi descoberto o gene plasmidial, *qnrA*, em *Klebsiella pneumoniae* isolado de amostra de urina de um paciente na Universidade do Alabama. *qnrS* foi descoberto em 2003 em *Shigella flexneri*, causadora de um surto de enterocolite no Japão. O gene *qnrB* foi detectado em uma investigação em cepas de *K. pneumoniae*, na Índia. *qnrC* detectado em cepa clínica de *Proteus mirabilis*, na China. Também na China foi descoberto *qnrD* de *Salmonella enterica*, isolada de humano. Em relação às bombas de efluxo, *qepA* foi descoberto em cepa de *Escherichia coli*, isolada de amostra de urina, no Japão. E *oqxAB* encontrado em *E. coli* isolada de esterco de porco.⁽¹⁴⁸⁾

Diferentes mecanismos plasmidiais de resistência às quinolonas já foram detectados em Enterobacteriaceae isoladas de animais de produção,⁽¹⁰⁸⁾ e carnes. O gene *qnrB* foi descrito em *Salmonella* spp. isoladas de carnes de frango, bovina e de salsichas na Colômbia,⁽⁸⁹⁾ e em *E. coli* isolada de frangos na Itália.⁽²⁶⁾ Na China, *oqxAB* foi descrito em *E. coli* carreadoras de frangos e porcos em fazendas de produção.⁽¹⁸⁸⁾ O gene *qnrB19* foi detectado em uma *Salmonella* isolada a partir de frango no Brasil, por Ferrari e colaboradores.⁽⁵⁴⁾

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento, identificação e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas do estudo

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com o método padronizado pela *Food and Drug Administration* (FDA), com algumas modificações,⁽⁴⁷⁾ no *Laboratório de Microbiologia* e no *Laboratório de Pesquisa em Virologia*, no *Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias*, da *Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto*.

Foram adquiridas onze amostras de carnes, dentre estas, três amostras de carne bovina, quatro de frango e quatro suína, em dias distintos, em seis diferentes estabelecimentos comerciais (denominados como A, B, C, D, E e F) na cidade de São José do Rio Preto – SP. Dos estabelecimentos A e B foram adquiridas amostras dos três tipos de carne suína, bovina e de frango, já no estabelecimento C foram adquiridas carnes resfriadas bovina e suína, nos estabelecimentos D e F, apenas carne resfriada de frango e no estabelecimento E, apenas carne resfriada suína. As amostras de carne foram obtidas de novembro de 2010 a agosto de 2012.

Inicialmente, foi realizado um estudo piloto, para o qual foram adquiridas uma amostra de carne resfriada bovina (CRB) – coxão mole –, uma carne resfriada de frango (CRF) – coxa com sobrecoxa – e uma carne resfriada suína (CRS) – pernil –, em datas distintas no estabelecimento A. Cada amostra de carne foi submetida à lavagem de superfície com três diferentes diluentes (caldo tetrionato contendo 5% de caldo verde brilhante, caldo lactosado e água peptonada 0,1%, todos *Oxoid*, Hampshire, Inglaterra),

visando determinar o mais adequado para a recuperação de *Salmonella* spp., que exige meios específicos e enriquecimento.

Dentre as amostras adquiridas para o estudo piloto, o pernil suíno resfriado foi a única amostra disposta em bandeja de isopor pelo próprio estabelecimento comercial; as demais foram adquiridas diretamente no açougue do estabelecimento. No laboratório de pesquisa, as amostras foram fracionadas em condições assépticas, no interior de capela de fluxo laminar com o auxílio de facas estéreis, de forma a obter aproximadamente três porções de 200 g de CRB, três porções de CRF e três de CRS. As porções foram acondicionadas individualmente em embalagens *Whirl-Pak*[®] estéreis de 532 mL (*Nasco*, WI, USA). Em cada uma de três embalagens para cada tipo de carne foi adicionado 200 mL de um dos diluentes (uma embalagem com água peptonada 0,1% mais 200 g de CRB ou CRF ou CRS, outra embalagem com caldo lactosado mais outra porção de 200 g de CRB ou CRF ou CRS e uma terceira embalagem com caldo tetracionato acrescido de 5% de caldo verde brilhante mais outra porção de CRB ou CRF ou CRS), obtendo-se, ao final, nove embalagens com conteúdos diferentes. A utilização de caldo tetracionato contendo 5% de caldo verde brilhante é um protocolo adotado pelo *Laboratório de Microbiologia* da empresa *Cobb-Vantress Brasil Ltda.*, unidade de Guapiaçu-SP, que foi validado pela referida empresa e descrito como promotor de excelente resultado na recuperação de *Salmonella* spp.

Após incubação a 37 °C por 24 horas sob agitação de 130 rpm, alíquotas de 1 mL de cada um dos três diluentes foram dispensadas em tubos contendo 9 mL de caldo lactosado, obtendo-se, assim, uma diluição de 10⁻¹ para cada diluente. As diluições seguiram, da mesma maneira, até atingirem a concentração de 10⁻⁵. Ao final das diluições, foram semeados 10 µL (com alça estéril calibrada) de cada diluição e direto

do diluente, em uma placa de Petri com ágar Eosina Azul de Metileno – EMB (*Oxoid*, Hampshire, Inglaterra) e outra contendo ágar MacConkey (*Oxoid*, Hampshire, Inglaterra), a fim de se capturar colônias características de *E. coli*. Para a recuperação de *Salmonella*, alíquotas de 1 mL e 0,1 mL foram dispensadas, respectivamente, em tubos contendo 10 mL de caldo tetrionato (caldo TT) ou de caldo Rappaport-Vassiliadis (caldo RV), ambos *Oxoid* (Hampshire, Inglaterra). As placas de ágar com as diluições e os tubos de caldo TT foram incubados a 37 °C por 24 horas, e os tubos inoculados de caldo RV foram incubados a 42 °C por 24 horas. Após a incubação, os caldos TT e RV foram semeados, com alça estéril calibrada de 10 µL, nos ágares Xilose Lisina Desoxicolato – XLD, Entérico de Hektoen – HE e Bismuto Sulfito – BS, todos os três da *Oxoid* (Hampshire, Inglaterra), e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

As colônias de coloração verde-metálica observadas no ágar EMB foram consideradas como *E. coli* e re-isoladas em EMB, sendo nomeadas como “Ec” seguido de um número na coleção de cultura. As demais colônias lactose positivas, bem como as colônias lactose positivas na ágar MacConkey, foram também coletadas, visando estudos futuros, e foram nomeadas “Lac” seguido de um número na coleção de cultura. As colônias que apresentaram características típicas de *Salmonella* spp. nos ágares XLD, HE e BS, foram coletadas, re-isoladas no mesmo ágar de origem e nomeadas com “S” seguido de um número na coleção de cultura. Posteriormente, estas colônias foram inoculadas nos ágares Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e Lisina Ferro (LIA), ambos da *Oxoid* (Hampshire, Inglaterra), visando à confirmação da identificação como *Salmonella* spp.

As amostras de carnes obtidas após o estudo piloto (três amostras de CRF – ambas coxa com sobrecoxa –, três mostras de CRS – ambas bisteca – e duas amostras

de CRB – ambas coxão mole) foram processadas utilizando-se o caldo tetrionato acrescido de 5% de caldo verde brilhante para a lavagem superficial das amostras, e o caldo TT como meio de enriquecimento seletivo. Essas amostras foram adquiridas nos estabelecimentos B, C e D.

Os isolados bacterianos do estudo foram cultivados em placas de ágar MacConkey e posteriormente, os isolados foram também submetidos ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos de acordo com as recomendações do CLSI.⁽³²⁾ Foram utilizados discos comercialmente disponíveis (*Oxoid* – Hampshire, Inglaterra) dos antimicrobianos Ácido Nalidíxico, Amicacina, Aztreonam, Cefalotina, Cefepime, Cefotaxima, Cefoxitina, Ceftazidima, Ceftiofur, Ceftriaxona, Enrofloxacin, Ertapenem, Gentamicina, Imipenem, Levofloxacin, Moxifloxacin, Ofloxacin e Tobramicina, e às combinações de β -lactâmico/inibidor de β -lactamase Amoxicilina/Ácido Clavulânico, Ampicilina/Sulbactam e Piperacilina/Tazobactam. Para alguns isolados foram utilizados Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Fosfomicina e Tetraciclina. As cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 foram utilizadas como controles. Os resultados foram interpretados de acordo com o CLSI,⁽³²⁾ exceto para a Moxifloxacin, que segue as normas do EUCAST,⁽⁴⁸⁾ e para o Ceftiofur e a Enrofloxacin, que seguem o CLSI de recomendações para bactérias isoladas de animais.⁽³¹⁾

Cepas de Enterobacteriaceae apresentando resistência a drogas β -lactâmicas com perfil sugestivo de produção de ESBLs foram selecionadas e submetidas à identificação automatizada, utilizando-se o sistema *Vitek*[®] 2 Compact e o cartão GN (*bioMérieux*, França), seguindo as orientações do fabricante.

3.2. Estudos moleculares

3.2.1. Extração do DNA genômico

Para a extração de DNA das amostras, foi desenvolvido o seguinte procedimento: uma colônia isolada, em ágar MacConkey, foi incubada por 24 horas a 37 °C em caldo Triptona de Soja – TSB (*Oxoid*, Hampshire, Inglaterra). Em seguida, 1,5 mL desse caldo foram centrifugados a 15000 G (12700 rpm) por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O “pellet” foi homogeneizado em 200 µL de água *Milli-Q* (*Millipore*) e submetido à nova centrifugação a 15000 G por 10 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi homogeneizado em 40 µL de água *Milli-Q* e incubado a 100 °C por 10 minutos. Após essa fase de liberação do DNA, a mistura foi submetida a choque térmico, em gelo, por 2 minutos e centrifugada a 15000 G por 10 segundos a 4 °C. O sobrenadante, contendo o DNA, foi acondicionado em outro tubo de polipropileno de 1,5 mL, previamente identificado, onde foram adicionados 500 µL de etanol absoluto (*Merck Chemicals*) (-20 °C) e deixado em gelo por 20 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 16000 G (13100 rpm) por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram, então, adicionados, 300 µL de etanol 70% (-20 °C) e, novamente, a mistura foi submetida à centrifugação a 16000 G por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e, após todo o etanol ter evaporado, o DNA foi homogeneizado com 100 µL de tampão TE e 2 µL de RNase (2 µg/mL) e incubados por 30 minutos a 37 °C em termobloco *Thermomixer comfort* (*Eppendorf*). O DNA foi estocado a -20 °C até o seu uso.

3.2.2. Detecção do ESBL por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para todas as reações de PCR realizadas no estudo foi utilizado o “kit” *Taq DNA Polymerase* (Fermentas, Life Sciences, MD, EUA) e o termociclador *Veriti Thermal Cycler*, (Applied Biosystems, EUA), à exceção do método de *Real-Time* PCR (ver seção 3.2.7.).

Nas cepas onde se constatou perfis de resistência aos antimicrobianos característicos da produção de alguma ESBL, foram realizadas PCR para detectar os genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}*, utilizando-se os *primers* descritos no **Quadro 1**.

Para a detecção de todos os genes de β -lactamases (*bla*), seguiu-se o mesmo protocolo.⁽¹⁷⁵⁾ Em tubo de polipropileno de 200 μ L, foram adicionados 2 μ L de DNA extraído e os seguintes reagentes: 2,5 μ L de tampão (10X), 2,0 μ L de $MgCl_2$ (25 mM), 1,0 μ L de dNTP (2,5 mM), 1,0 μ L de cada *primer* (10 μ mol/ μ L), 0,2 μ L de *Taq DNA Polymerase* (5 U/ μ L) e q.s.p. 25 μ L de água *UltraPure* (Invitrogen, CA, EUA). Os tubos foram colocados em termociclador, programado com passo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos sequenciais de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, hibridização a 53 °C – para os genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* – ou a 55 °C – para *bla_{CTX-M}* – por 30 segundos, e extensão a 72 °C por 30 segundos, com uma fase de extensão final a 72 °C por 7 minutos. Uma reação sem amostra de DNA foi utilizada como controle negativo; como controle positivo para cada reação, foram utilizados DNA de cepas bacterianas pré-caracterizadas por sequenciamento no *Laboratório de Microbiologia* da FAMERP, para a presença de *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}*. Os produtos amplificados nas reações (“amplicons”) foram analisados em gel de agarose a 1,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 μ L/100 mL). A eletroforese foi

realizada a 100 V/cm por 60 minutos, utilizando o marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen*, CA, EUA). O resultado foi observado sob luz ultravioleta e fotografado utilizando o aparelho *Kodak Gel Logic 2200 Imaging System (Molecular Imaging Software)*.

Quadro 1. *Primers* utilizados nas PCR de detecção e ERIC-PCR.

Método	Alvo	Sequência do primer 5'-3'	Referência
PCR-Convencional	<i>bla</i> _{CTX-M}	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	Tollentino et al., 2011
PCR-Convencional	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	ATGATGACTCAGAGCATTTCG TGGGTTACGATTTTCGCCGC	Saladin et al., 2002
Sequenciamento	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	AGCTGGAAGCCCTGGAGAAAAG TTTCTCCAGGGCTTCCAGC ATCAAGAAGAGCGACCTGG TGATTTCAACGCGCTGATTTAG CACGCTCAATACCGCCATTC AATGGCGGTATTGAGCGTGG TAGTGGGCGATAAAAACCGGCAG CTACCCATGATTTCCGGCAGAC	Tollentino et al., 2011
PCR-Convencional	<i>bla</i> _{SHV}	GCGTTATTCTTATTTGTCGC TTAGCGTTGCCAGTGCTC	Rasheed et al., 1997 e Tollentino et al., 2011
Sequenciamento	<i>bla</i> _{SHV}	GGGTTATTCTTATTTGTCGC TTAGCGTTGCCAGTGCTC GAACAGCTGGAGCGAAAGAT CAGATCGGCGACAACGTCAC CTGCAGTGGATGGTGGACGA CCTGCTTGGCCCGAATAACA GTGACGTTGTGCCCCATCTG ATCTTTCGCTCCAGCTGTTC TAATTTGCTCAAGCGGCTGC	Rasheed et al., 1997 e Tollentino et al., 2011
PCR-Convencional	<i>bla</i> _{TEM}	ATAAAATCTTGAAGACGAAA GACAGTTACCAATGCTTAATCA	Tollentino et al., 2011
Sequenciamento	<i>bla</i> _{TEM}	TCAACATTTTCGTGTCGC AAAGGGAATAAGGGCGACAC CGTTTTCCAATGATGAGCAC TCGGGGCGAAAACCTCTCAAG CATGAGTGATAAACTGCTGC TTGGCAGCAGTGTATCACTC ACTACTTACTCTAGCTTCCCG TTAATTGTTGCCGGGAAGC	Tollentino et al., 2011

3.2.3. Detecção do gene *qnr* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para as PCR foi utilizado o kit *Taq DNA Polymerase* (Fermentas, Life Sciences, MD, EUA) e seguiram o seguinte protocolo: em tubos de polipropileno, foram adicionados 2 µL de DNA e os seguintes reagentes: 2,5 µL de tampão (10X), 2,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,0 µL de dNTP (2,5 mM), 1,0 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 0,2 µL de *Taq DNA Polymerase* (5 U/µL) e q.s.p. 25 µL de água *Ultra-Pure* (Invitrogen, CA, EUA).

A amplificação de *qnr* foi realizada utilizando-se uma *Multiplex-PCR* com os *primers* específicos para detecção dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*, como consta no **Quadro 2** e metodologia descrita por Cattoir et al.,⁽²³⁾ amplificando um fragmento conservado do gene de 580 pb para *qnrA*, 264 pb para *qnrB* e 428 pb para *qnrS*. Os parâmetros da reação foram: desnaturação inicial a 95 °C, por 10 minutos, seguido de 35 ciclos com as etapas de desnaturação a 95 °C, por 1 minuto, hibridização a 54 °C, por 1 minuto e extensão a 72 °C, por 1 minuto, com uma última etapa de extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Para a amplificação de *qnrC*, *qnrD*, *qepA* e *oqxAB* foi seguido o mesmo protocolo anteriormente descrito utilizando os *primers* específicos, como apresentado no **Quadro 2**. Os parâmetros da reação para detecção de *qnrC* e *qnrD* foram: desnaturação inicial a 95 °C, por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com as etapas de desnaturação a 95 °C, por 45 segundos, hibridização a 50 °C, por 1 minuto e extensão a 72 °C, por 45 segundos, posteriormente uma extensão final a 72 °C, por 7 minutos. Para detecção de *qepA*, apenas foi alterada a temperatura de hibridização para 65 °C. Por fim, para detecção de *oqxAB*, foram seguidos: desnaturação inicial de 95 °C, por 5 minutos,

uma sequência de 35 ciclos com as etapas de desnaturação a 95 °C, por 1 minuto, hibridização a 53,8 °C, por 30 segundos, extensão a 72 °C, por 5 minutos e extensão final a 72°C, por 10 minutos, amplificando um fragmento de 5140 pb.

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, CA, USA). Cepas bacterianas pré-caracterizadas por sequenciamento para presença de *qnr* foram utilizadas como controle positivo e os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2,0% para *qnr* e 1.0% para as demais, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL/100 mL). Realizou-se a eletroforese a 100 V/cm, por 60 minutos, utilizando o marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen*, CA, EUA). O resultado foi observado sob luz ultravioleta e fotografado utilizando o Sistema de Fotodocumentação *L-Pix EX Molecular Imaging* (*Software* de Captura de Imagem *L-Pix Image* – *Loccus biotecnologia*, SP, Brasil).

Quadro 2. *Primers* usados para a detecção e sequenciamento de genes de resistência às quinolonas.

Método	Alvo	Seqüência do <i>primer</i> 5'-3'	Referência
PCR-Multiplex e Sequenciamento	<i>qnrA</i>	AGAGGATTTCTCACGCCAGG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	Cattoir et al., 2007
	<i>qnrB</i>	GGMATHGAAATTCGCCACTG TTTGCYGYCYGCCAGTCGAA M=A ou C; H=A ou C ou T; Y=C ou T	
	<i>qnrS</i>	GCAAGTTCATTGAACAGGGT TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	
Sequenciamento	<i>qnrB</i>	ATGACGCCATTACTGTATAAAAAAAC CTAGCCAATAATCGCGATGCC	Presente estudo
PCR-Convencional	<i>qnrD</i>	TTTTCGCTAACTAACT GAAAGGATAAACAGGCAAAT	Zhao et al., 2010
PCR-Convencional	<i>qnrC</i>	GGGTTGTACATTTATTGAATC TCCACTTTACGAGGTTCT	Wang et al., 2009
PCR-Convencional	<i>qepA</i>	CGGCGGCGTGTGCTGGAGTTCTT CCGACAGGCCACGACGAGGATGC	Ma et al., 2009
PCR-Convencional	<i>oqxAB</i>	CCCTGGACCGCACATAAAG AAAGAACAAGATTCACCGCAAC	Zhao et al., 2010

3.2.4. Multiplex-PCR

A fim de se testar um novo protocolo que reduza tempo e material gasto com PCR para a detecção dos três principais genes responsáveis pela resistência aos β -lactâmicos detectados em Enterobacteriaceae, ou seja, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}, foi desenvolvido um método de multiplex-PCR. Para tanto, foram utilizados os mesmos pares de *primers* das PCR convencionais (**Quadro 1**). Em tubo de polipropileno de 200 μ L, foram adicionados 2 μ L de DNA extraído e os seguintes reagentes: 2,5 μ L de tampão (10X), 2,0 μ L de MgCl₂ (25 mM), 2,0 μ L de dNTP (2,5 mM), 1,0 μ L de cada

um dos seis *primers* (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$), 0,2 μL de *Taq DNA Polymerase* (5 U/ μL) e q.s.p. 25 μL de água *UltraPure*. Os tubos foram colocados em termociclador, programado com passo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos sequenciais de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, hibridização a 53 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, com uma fase de extensão final a 72 °C por 7 minutos. Uma reação sem amostra de DNA foi utilizada como controle negativo e, como controle positivo, foi utilizado o DNA de uma cepa bacteriana contendo *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}*, pré-caracterizada por sequenciamento no *Laboratório de Microbiologia* da FAMERP.

Os “amplicons” foram analisados em gel de agarose a 1,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$) e possuem os mesmos tamanhos de banda encontrados na amplificação de PCR convencional para esses genes. A eletroforese foi realizada a 100 V/cm por 60 minutos, utilizando o marcador de peso molecular de 100 pb (*Fermentas, Life Sciences*, MD, EUA). O resultado foi observado sob luz ultravioleta e fotografado conforme descrito anteriormente.

Quando mais de um gene foi detectado em uma mesma bactéria, foi realizada uma PCR convencional, como descrito na seção **3.2.2**, para amplificar os genes separadamente e purificá-los, proporcionando melhor resultado na RFLP, no caso dos genes *bla_{CTX-M}*, e nos sequenciamentos desses três genes, como descrito no **Quadro 1**.

3.2.5. Purificação dos “amplicons”

Todos os produtos obtidos nas reações de PCR foram purificados com etanol. O “amplicon” de cada reação foi transferido para um tubo de polipropileno de 1,5 mL

previamente identificado, onde foram adicionados acetato de sódio 3 M e etanol absoluto, nas proporções de 10% e 3 vezes, respectivamente, do volume de “amplicons” que foi purificado. Os tubos foram colocados em freezer -80 °C por 1 hora para a precipitação do DNA. Em seguida, foram centrifugados a 16000 G por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 70%. Por fim, os tubos foram centrifugados a 16000 G por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi homogeneizado em 20 µL de tampão TE e estocado a -20 °C até o seu uso.

3.2.6. Agrupamento dos genes *bla*_{CTX-M} por RFLP

A análise de RFLP – *Restriction Fragment Length Polimorfism* – foi realizada para agrupar os genes *bla*_{CTX-M} identificados entre os grupos previamente descritos por Bonnet em 2004.⁽⁸⁾ As endonucleases de restrição utilizadas foram selecionadas de acordo com metodologia descrita em 2003 por Edelstein e colaboradores.⁽⁴³⁾ Os padrões de restrição dos produtos de PCR, gerados pelas endonucleases *PstI* e *PvuII* para a diferenciação entre os grupos de CTX-M, estão descritos no **Quadro 3**, abaixo.

Quadro 3. Padrões de restrição gerados pelas endonucleases nos genes codificadores de CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-8.

Grupos de <i>bla</i> _{CTX-M}	Sítios de Restrição		Tamanhos da bandas após a digestão (pb)
	<i>PstI</i>	<i>PvuII</i>	
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	0	2	267, 156, 121
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	1	0	355, 188
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	0	0	544

Diferentes enzimas do grupo CTX-M-9 apresentam diferentes perfis de restrição quando digeridas com as enzimas *PstI* e *PvuII*. Os genes *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-13} e *bla*_{CTX-M-16} são digeridos pelas duas enzimas em diferentes sítios de restrição, gerando um padrão de digestão com 3 bandas de 426, 72 e 46 pb. Os genes *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-17}, *bla*_{CTX-M-19}, e *bla*_{CTX-M-21} são digeridos apenas pela enzima *PvuII* em 1 sítio de restrição, gerando duas bandas de 472 e 72 pb.

Para a reação de RFLP, 10 µL de DNA purificado das cepas foram adicionados em tubo de polipropileno de 1,5 mL, previamente identificado, juntamente com os seguintes reagentes (*Invitrogen*, CA, EUA), de acordo com a metodologia descrita por Edelstein e colaboradores (2003): 2,0 µL de tampão React II (10X), 2,0 µL de BSA (100X), 1,0 µL de enzima *PstI* (10 U/µL), 0,5 µL de enzima *PvuII* (10 U/µL) e q.s.p. 20 µL de água *UltraPure*. Os tubos foram incubados a 37 °C por 3 horas em termobloco *Thermomixer comfort* (*Eppendorf*). Os produtos foram analisados em gel de agarose a 2,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL/100 mL). A eletroforese foi realizada a 50 V/cm por 120 minutos, utilizando o marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen*, CA, EUA). O resultado foi observado sob luz ultravioleta e fotografado conforme descrito anteriormente.

3.2.7. Confirmação da identificação de *Salmonella* spp. através da técnica de PCR em Tempo Real (qPCR)

As colônias que apresentaram morfologia típica de *Salmonella* spp. nos ágaros TSI e LIA foram submetidas ao teste molecular de identificação pelo método de *Real-Time* PCR (qPCR), cujos *primers* utilizados têm como alvo o gene *invA*. Este

procedimento foi, em grande parte, realizado no *Laboratório de Microbiologia* da empresa *Cobb-Vantress Brasil Ltda.*, unidade de Guapiaçu-SP, que emprega modificações do protocolo padronizado por Charlton e colaboradores (2005). Em microplacas *MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate* (*Applied Biosystems*, CA, EUA) foram adicionados em cada poço: 5 µL do “kit” *Fast SYBR[®] Green Master Mix* (*Applied Biosystems*, CA, EUA), 1 µL de cada *primer* na concentração de 10 pmol/µL (**Tabela 1**) e 3 µL do DNA extraído da amostra testada. A reação ocorreu em termociclador *StepOne Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, CA, EUA) sob as condições de ativação da enzima a 95 °C por 20 segundos, e 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 3 segundos e anelamento e extensão a 60 °C por 30 segundos; por fim, para a confecção da curva de temperatura, as amostras foram submetidas a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos. Usando como controle uma cepa padrão de *Salmonella*, as cepas com a temperatura de “melting” por volta de 74 °C foram consideradas como pertencentes ao gênero, pois essa temperatura varia entre as taxas bacterianas e é específico de cada um, sofrendo alterações de acordo com o protocolo utilizado.

3.2.8. Sequenciamento dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *qnrA*, *qnrS* e *qnrB*

Os “amplicons” purificados logo após as reações de PCR para a detecção de genes de ESBLs e *qnr* foram submetidos ao sequenciamento com o *Big Dye Terminator Kit v3.1* (*Applied Biosystems*, CA, EUA), segundo as recomendações do fabricante, com a finalidade de identificar os tipos de ESBL e *qnr*, as possíveis mutações e suas associações com os fenótipos de resistências apresentados.

Somente para o gene *bla*_{CTX-M} ocorreu uma reação de PCR anterior ao sequenciamento. Após a RFLP, onde se determinou a qual grupo de *bla*_{CTX-M} pertencia o gene detectado, este foi amplificado com *primers* específicos para o grupo encontrado (**Quadro 3**), de acordo com Saladin e colaboradores⁽¹⁵¹⁾: em tubos de polipropileno de 200 µL foram adicionados 2 µL do DNA extraído e os seguintes reagentes: 5,0 µL de tampão (10X), 4,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 4,0 µL de dNTP (2,5 mM), 2,5 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 0,2 µL de *Taq DNA Polymerase* (5 U/µL) e q.s.p. 50 µL de água *UltraPure*. Inicialmente, o DNA foi desnaturado a 95 °C por 5 minutos, sendo submetido a 25 ciclos com as etapas de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 56 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os produtos de todas as reações foram analisados em gel de agarose a 1,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL/100 mL) e a eletroforese foi realizada a 100 V/cm por 60 minutos, com o marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen*, CA, EUA) para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. Os géis foram visualizados e fotografados conforme descrito anteriormente.

Na PCR para o sequenciamento gênico, foram utilizados 4,0 µL de solução tamponante (10X), 2,0 µL de *Big Dye Terminator*, 1,0 µL de *primer* específico (3,2 pmol/µL), 1,0 µL de DNA purificado e q.s.p. 20,0 µL de água *UltraPure*. A amplificação foi realizada com 25 ciclos de desnaturação a 96 °C por 30 segundos, hibridização a 50 °C por 15 segundos, extensão a 60 °C por 4 minutos. Os *primers* utilizados em todos os sequenciamentos encontram-se descritos no **Quadro 1 e 2**.

Os produtos amplificados foram submetidos à precipitação. Os “amplicons” foram dispensados em tubo de polipropileno de 1,5 mL e adicionados 80 µL de isopropanol 75%. Após incubação por 20 minutos a temperatura ambiente, as amostras

foram centrifugadas por 20 minutos, a 16000 G, 4°C. Após, o sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas com 1,0 mL de etanol 70%, centrifugadas por 15 minutos a 16000 G, 4°C. O sobrenadante foi totalmente descartado e, após a evaporação completa do etanol, o DNA precipitado foi reconstituído em 10 µL de formamida *high dye* (pH 7,0).

Após precipitado, o DNA foi desnaturado a 95 °C por 2 minutos e levado ao aparelho de sequenciamento *3130 Genetic Analyser* (*Applied Biosystems-HITACHI*) e submetido à eletroforese em capilar. As sequências foram analisadas com auxílio dos programas *DS Gene 2.0* (*Accelrys*, EUA) e *BLAST*, este último disponível no *site* do NCBI.⁽¹²³⁾

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella* nas amostras de carnes de frango, suína e bovina

Este estudo foi planejado visando à avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em *Escherichia coli* e *Salmonella* isoladas de amostras de carnes de frango, suína e bovina comercializadas em São José do Rio Preto-SP, e a identificação nestes isolados dos genes que codificam β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e resistência a quinolonas.

Ao todo, foram isoladas 420 colônias bacterianas. *Salmonella* spp. foi isolada na primeira amostra de CRS (analisada no estudo piloto) e na última. Sete isolados tiveram a identificação como *Salmonella* spp. confirmadas através da qPCR e duas pelo *Vitek*[®] 2 *Compact*. Nas demais amostras de carnes avaliadas neste estudo, esta bactéria não foi encontrada.

As amostras de carne onde foram detectadas a presença de *Salmonella* spp. foram fracionadas e acondicionadas em bandeja de isopor pelo estabelecimento comercial. Assim, é possível que a manipulação no estabelecimento pode ter sido a causa da contaminação, já que a presença de microrganismos patogênicos nas mãos de manipuladores e a possibilidade de transferência para os alimentos é conhecida.⁽²⁾ Por outro lado, suínos e aves podem carrear cepas de *Salmonella* que podem ser transmitidas para humanos através da cadeia alimentar.⁽⁹⁰⁾

Com relação à *Escherichia coli*, 21 isolados (nenhum deles presuntivamente identificado como tal em ágar EMB), tiveram identificação confirmada pelo sistema

Vitek® 2 Compact. Além disso, alguns isolados presuntivamente identificados como *Escherichia coli* (Ec) foram posteriormente identificados como outras espécies da família Enterobacteriaceae (Tabela 1 e Anexo 1). Das 21 *E. coli*, 12 foram isoladas de CRF e nove de CRS. Na Figura 1, são observadas as colônias com morfologia típica de *E. coli* e de *Salmonella* spp. nos diferentes meios de cultura semissólidos utilizados para o isolamento e identificação presuntiva.

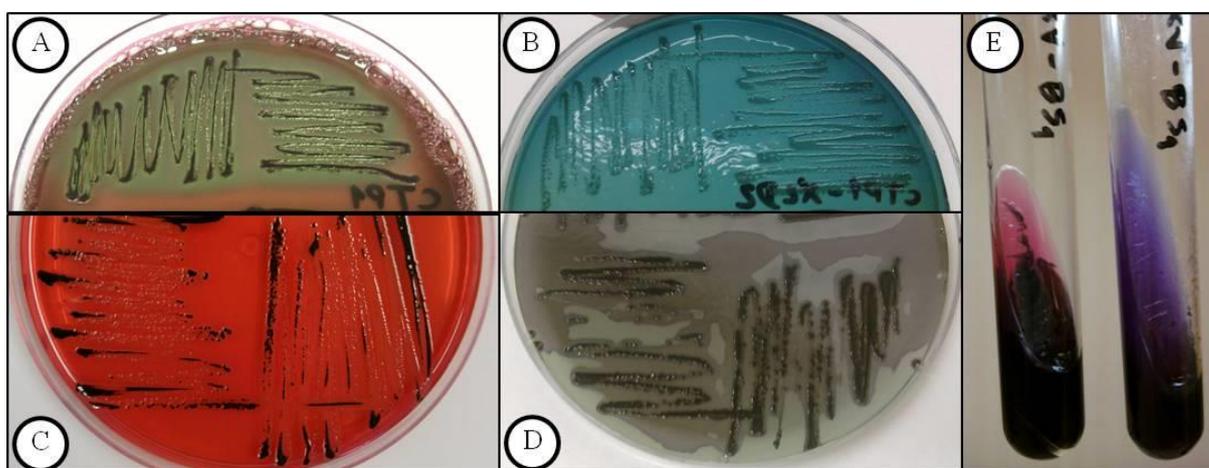


Figura 1. Características bioquímicas das cepas isoladas em ágar no estudo. [A) Coloração verde-metálica de cepas de *Escherichia coli* em ágar EMB. B) Coloração azul-esverdeada – podendo haver precipitação de H₂S ou não, deixando a colônia com centro negro – de cepas de *Salmonella* em ágar HE. C) Coloração vermelha transparente – podendo haver precipitação de H₂S ou não, deixando a colônia com centro negro – de cepas de *Salmonella* em ágar XLD. D) Coloração marrom a negra de cepas de *Salmonella* em ágar BS. E) Característica dos ágares TSI – à esquerda – e LIA – à direita – quando inoculados com uma cepa de *Salmonella*.]

As carnes são os principais alimentos responsáveis pela veiculação de patógenos ao homem,⁽⁷⁶⁾ e *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* estão entre os principais patógenos veiculados por produtos cárneos.⁽¹⁴⁵⁾ Durante um estudo que avaliou 68 surtos de doenças transmitidas por alimentos no Noroeste do Estado de São Paulo, 32 (47,06%)

foram causados por diferentes sorotipos de *Salmonella* spp.⁽¹³²⁾ Em estudo conduzido pelo Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto-SP,⁽³⁾ a carne e seus derivados foram as principais fontes de *Salmonella* spp. No Rio Grande do Sul, um estudo avaliou diferentes tipos de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis e revelou que 13,6% dos alimentos continham carne de frango em sua formulação.⁽¹⁵²⁾ Um estudo, nos Estados Unidos, determinou *Salmonella* spp. como o agente etiológico mais comumente envolvido (36,0%) em um surto de doenças transmitidas por alimentos registrado em escolas, estando, as carnes, envolvidas entre os alimentos referidos.⁽³⁷⁾

No presente estudo, a proporção de cepas de *Salmonella* spp. isoladas não reflete os resultados descritos por outros autores. É possível que a metodologia utilizada, em que foram submetidas à identificação somente isolados que apresentaram resistência aos antimicrobianos possa ter levado a subquantificação de *Salmonella* spp.

Com relação as *E. coli*, a baixa proporção pode estar associada à utilização do caldo tetracionato acrescido de 5% de caldo verde-brilhante para a lavagem de superfície e recuperação dos patógenos. Este meio visa uma maior recuperação de *Salmonella* spp., já que este gênero utiliza o radical tetracionato na cadeia respiratória, favorecendo seu crescimento em detrimento de outras espécies.⁽⁸⁶⁾

Tabela 1. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, fonte de isolamento e identificação das cepas que apresentaram genes de resistência.

Isolado	Data do Isolamento	Local	Fonte de Isolamento	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm) ^a																	Diversidade genética					
					AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV		ENO	OFX	MXF ^b	NA	CIP
					R ≤ 13 S ≥ 18	R ≤ 11 S ≥ 15	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 22 S ≥ 26	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 13 S ≥ 17		R ≤ 15 S ≥ 21	R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 16 S ≥ 20	R ≤ 13 S ≥ 19	R ≤ 15 S ≥ 21
S11	14/03/2011	A	CRF	<i>Proteus mirabilis</i>	13	13	25	6	11	11	18	12	21	24	26	16	20	15	18	18	19	12	14	10	6	NT	<i>bla</i> _{CTX-M-2} / Negativo <i>qnr</i>
S23	04/04/2011	A	CRB	<i>Citrobacter freundii</i>	8	6	17	6	26	9	10	13	6	8	12	12	26	18	20	20	30	NT	28	28	26	NT	<i>bla</i> _{GES-like}
S36	25/04/2011	B	CRS	<i>Citrobacter youngae</i>	6	8	20	6	30	11	11	12	8	11	18	28	24	23	24	24	32	NT	30	28	24	NT	<i>bla</i> _{SHV-like}
S49	25/04/2011	B	CRF	<i>Citrobacter youngae</i>	6	6	26	11	28	29	24	29	6	6	30	15	26	22	24	18	23	NT	17	12	20	NT	<i>qnrB</i>
S51	25/04/2011	B	CRF	<i>Citrobacter youngae</i>	11	20	25	14	34	6	6	10	6	29	34	34	26	23	24	23	23	NT	23	20	19	NT	<i>bla</i> _{SHV-like}
S54	25/04/2011	B	CRB	<i>Citrobacter youngae</i>	12	18	23	18	30	26	22	25	6	23	24	30	22	17	12	19	25	NT	15	18	16	NT	<i>qnrB</i>
S68	11/07/2011	C	CRB	<i>Citrobacter freundii</i>	6	6	18	6	26	14	9	10	6	6	17	18	24	23	18	23	29	28	30	28	23	NT	<i>bla</i> _{SHV-like}
S88	11/07/2011	C	CRS	<i>Citrobacter youngae</i>	6	6	18	6	26	6	9	8	6	8	14	24	24	22	23	23	26	23	24	23	22	NT	<i>bla</i> _{TEM-1}
S94	23/08/2011	D	CRF	<i>Escherichia coli</i>	8	6	20	6	27	22	20	24	12	17	19	24	28	21	NT	19	22	19	NT	NT	6	NT	<i>oqxAB</i>
S104	23/08/2011	D	CRF	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	12	22	18	28	30	24	28	22	24	28	26	29	18	NT	18	18	15	NT	16	12	NT	<i>qnrB19</i> / <i>oqxAB</i>
S105	23/08/2011	D	CRF	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	6	20	6	13	10	9	9	25	20	17	22	26	10	NT	20	20	16	NT	16	16	NT	<i>bla</i> _{CTX-M-2} / <i>bla</i> _{SHV-11} / <i>bla</i> _{TEM-1} / <i>qnrS1</i> / <i>oqxAB</i>
S109	23/08/2011	D	CRF	<i>Citrobacter freundii</i>	20	23	6	14	30	30	24	29	14	26	30	34	26	26	NT	22	24	21	NT	NT	6	NT	<i>qnrB</i>
S116	23/08/2011	D	CRF	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	13	18	6	16	14	12	13	24	17	22	22	29	18	NT	20	24	24	NT	NT	22	NT	<i>bla</i> _{SHV-2}
S137	23/08/2011	D	CRF	<i>Escherichia coli</i>	16	10	26	6	18	15	14	14	29	26	21	32	32	22	NT	22	30	30	NT	NT	22	NT	<i>bla</i> _{CTX-M-2-like} / <i>bla</i> _{TEM-1}
S143	23/08/2011	D	CRF	<i>Escherichia coli</i>	23	23	30	20	34	33	NT	30	27	30	34	34	30	22	NT	22	24	22	20	22	8	NT	<i>oqxAB</i>
S147	23/08/2011	D	CRF	<i>Aeromonas sobria</i>	14	6	24	25	32	36	NT	36	30	30	36	18	19	20	NT	21	23	18	22	17	6	NT	<i>qnrA</i> / <i>qnrS</i>
S178	23/08/2011	D	CRF	<i>Escherichia coli</i>	24	24	28	20	32	32	NT	30	28	30	34	32	28	22	NT	22	25	20	20	20	7	NT	<i>oqxAB</i>
S183	23/08/2011	D	CRF	<i>Escherichia coli</i>	22	22	30	18	36	34	NT	32	26	30	32	36	30	22	NT	22	24	19	19	21	6	NT	<i>oqxAB</i>
S201	20/03/2012	E	CRS	<i>Salmonella</i> spp.	14	14	20	15	28	26	21	27	24	24	29	30	30	10	18	18	10	8	9	8	6	4*	<i>qnrB</i>
S203	20/03/2012	E	CRS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	18	22	20	28	28	24	28	23	24	27	22	24	17	18	18	18	18	17	16	15	0,5*	<i>qnrB2</i>
S204	20/03/2012	E	CRS	<i>Salmonella</i> spp.	14	13	22	16	28	26	22	28	24	24	30	30	30	12	18	22	10	7	7	7	6	4*	<i>qnrB</i>
S205	20/03/2012	E	CRS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	16	24	19	30	28	22	30	24	24	29	27	29	12	19	18	18	17	17	15	18	0,5*	<i>bla</i> _{SHV-1} / <i>qnrB2</i>

* De acordo com CLSI.^(31,32)

^a Determinação do halo de suscetibilidade de acordo com EUCAST.⁽⁴⁸⁾

Local: estabelecimento comercial onde foi obtida a amostra de carne.

AK: amicacina; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CN: gentamicina; CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima; EFT: ceftiofur; ENO: enrofloxacina; ETP: ertapenem; FEP: cefepima; FOX: cefoxitina; IPM: imipenem; KF: cefalotina; LEV: levofloxacina; MXF: moxifloxacina; NA: ácido nalidíxico; OFX: ofloxacina; SAM: ampicilina/sulbactam; TOB: tobramicina; TZP: piperacilina/tazobactam.

NR: teste não realizado ou inconclusivo. NT: antibiótico não testado. “Mesma cepa”: cepas com o mesmo perfil de ERIC-PCR.

R: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano (números marcados em vermelho); S: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano (números marcados em preto); valores intermediários a R e S indicam resistência intermediária ao antimicrobiano (números marcados em verde).

Tabela 1 (continuação). Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, fonte de isolamento e identificação das cepas que apresentaram genes de resistência.

Isolado	Data do Isolamento	Local	Fonte de Isolamento	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																				Diversidade genética		
					AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO	OFX	MXF ^a		NA	CIP
					R ≤ 13	R ≤ 11	R ≤ 17	R ≤ 14	R ≤ 14	R ≤ 22	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 14	R ≤ 17	R ≤ 17	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 12	R ≤ 12	R ≤ 14	R ≤ 13	R ≤ 15	R ≤ 12	R ≤ 16		R ≤ 13	R ≤ 15
Ec27	25/04/2011	B	CRB	<i>Citrobacter braakii</i>	6	10	19	6	30	16	12	12	6	15	12	16	21	17	18	19	26	6	24	20	23	NT	<i>qnrB</i>
Ec28	25/04/2011	B	CRB	<i>Citrobacter braakii</i>	6	6	19	6	31	24	17	16	6	19	24	14	26	16	21	20	24	6	24	21	22	NT	<i>qnrB</i>
Ec29	25/04/2011	B	CRB	<i>Citrobacter freundii</i>	8	8	24	12	26	31	23	25	6	18	25	22	24	16	20	20	24	14	22	22	23	NT	<i>qnrB</i>
Ec30	25/04/2011	B	CRB	<i>Citrobacter braakii</i>	12	18	27	12	28	30	24	30	6	28	30	25	30	18	23	18	30	12	25	22	23	NT	<i>qnrB</i>
Ec32	25/04/2011	B	CRF	<i>Citrobacter diversus</i>	13	19	25	12	26	24	22	14	7	26	24	12	24	18	19	20	30	28	26	24	24	NT	<i>bla</i> _{CTX-M-2}
Ec33	25/04/2011	B	CRF	<i>Citrobacter freundii</i>	6	6	26	6	NT	25	20	23	6	23	17	18	24	17	18	19	28	NT	26	20	10	NT	<i>qnrB</i>
Ec37	25/04/2011	B	CRS	<i>Citrobacter freundii</i>	12	16	26	6	26	28	24	28	6	24	28	21	24	18	18	20	24	NT	22	22	16	NT	<i>qnrB</i>
Ec45	11/07/2011	C	CRB	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	8	18	6	22	7	7	10	10	14	16	26	23	20	29	26	27	22	28	24	NT	<i>bla</i> _{SHV-like}	
Lac3	16/11/2010	A	CRS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	22	25	18	28	30	NT	30	22	30	32	28	29	18	20	18	11	NT	8	10	6	NT	<i>oqxAB</i>
Lac11	25/04/2011	B	CRB	<i>Citrobacter freundii</i>	6	18	26	12	32	30	NT	30	6	24	28	20	NT	20	20	22	26	6	NT	24	18	NT	<i>bla</i> _{SHV-like} / <i>bla</i> _{GES-like} / <i>qnrB</i>
Lac22	11/07/2011	C	CRS	<i>Citrobacter freundii</i>	10	14	23	6	36	30	25	30	6	28	34	26	17	18	24	22	22	18	19	19	6	NT	<i>qnrB</i>
Lac55	23/08/2011	D	CRF	<i>Escherichia coli</i>	14	12	23	6	18	16	NT	14	25	24	22	29	26	20	NT	20	22	16	18	16	10	NT	<i>qnrB19</i> / <i>bla</i> _{TEM-1}
Lac60	23/08/2011	D	CRF	<i>Escherichia coli</i>	18	10	28	6	15	10	NT	10	28	24	16	30	30	22	NT	22	20	14	17	17	6	NT	<i>bla</i> _{CTX-M-2} / <i>oqxAB</i>
Lac87	20/03/2012	E	CRS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	17	24	20	28	24	22	30	24	26	30	30	26	10	18	18	18	18	17	14	17	19	<i>qnrB2</i> / <i>oqxAB</i> / <i>bla</i> _{SHV-1}
Lac88	20/03/2012	E	CRS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	18	24	19	26	24	18	29	22	25	28	28	30	18	18	18	25	28	25	22	23	28	<i>oqxAB</i> / <i>bla</i> _{SHV-1}
Lac96	20/03/2012	E	CRS	<i>Citrobacter braakii</i>	10	20	28	12	36	32	26	34	7	28	34	30	30	17	17	18	20	20	22	18	11	0,25*	<i>qnrB19</i>
Lac98	20/03/2012	E	CRS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19	16	18	18	24	24	22	29	20	24	26	24	26	18	21	18	25	26	21	24	24	26	<i>oqxAB</i> / <i>bla</i> _{SHV-11}
Lac99	20/03/2012	E	CRS	<i>Escherichia coli</i>	16	13	24	13	24	26	22	26	24	24	26	30	26	18	18	18	7	6	8	6	6	12	<i>oqxAB</i>
Lac100	20/03/2012	E	CRS	<i>Escherichia coli</i>	20	18	26	18	30	30	24	30	26	28	30	32	30	14	20	19	8	6	7	7	6	7	<i>oqxAB</i>
Lac105	20/03/2012	E	CRS	<i>Escherichia coli</i>	18	18	24	16	30	30	20	28	26	26	30	34	30	19	18	18	12	7	8	8	6	12	<i>oqxAB</i>
Lac106	20/03/2012	E	CRS	<i>Escherichia coli</i>	18	18	25	15	29	NT	20	24	24	27	27	30	28	19	21	20	14	10	12	9	6	14	<i>bla</i> _{SHV} / <i>bla</i> _{TEM}

* De acordo com CLSI. (31,32)

^a Determinação do halo de suscetibilidade de acordo com EUCAST. (48)

Local: estabelecimento comercial onde foi obtida a amostra de carne.

AK: amicacina; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CN: gentamicina; CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima; EFT: ceftiofur; ENO: enrofloxacina; ETP: ertapenem; FEP: cefepima; FOX: cefoxitina; IPM: imipenem; KF: cefalotina; LEV: levofloxacina; MXF: moxifloxacina; NA: ácido nalidíxico; OFX: ofloxacina; SAM: ampicilina/sulbactam; TOB: tobramicina; TZP: piperacilina/tazobactam.

NR: teste não realizado ou inconclusivo. NT: antibiótico não testado. “Mesma cepa”: cepas com o mesmo perfil de ERIC-PCR.

R: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano (números marcados em vermelho); S: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano (números marcados em preto); valores intermediários a R e S indicam resistência intermediária ao antimicrobiano (números marcados em verde).

Tabela 1 (continuação). Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, fonte de isolamento e identificação das cepas que apresentaram genes de resistência.

Isolado	Data do Isolamento	Local	Fonte de Isolamento	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*											Diversidade genética		
					AMC	CTX	EFT	FOX	CAZ	CN	AK	CIP	ENO	NA	TE		FOS	C
					R ≤ 13	R ≤ 22	R ≤ 19	R ≤ 14	R ≤ 17	R ≤ 12	R ≤ 14	R ≤ 15	R ≤ 15	R ≤ 13	R ≤ 11		R ≤ 12	R ≤ 12
					S ≥ 18	S ≥ 26	S ≥ 23	S ≥ 18	S ≥ 21	S ≥ 15	S ≥ 17	S ≥ 21	S ≥ 21	S ≥ 19	S ≥ 15	S ≥ 16	S ≥ 18	
Ec56	27/08/2012	F	CRF	<i>Escherichia coli</i>	18	30	24	26	28	20	19	28	19	16	6	10	NT	<i>qnrB19</i>
Ec57	27/08/2012	F	CRF	<i>Escherichia coli</i>	24	32	26	28	30	6	22	30	22	18	6	29	NT	<i>qnrB19 / oqxAB</i>
Ec58	27/08/2012	F	CRF	<i>Escherichia coli</i>	20	30	24	24	26	20	20	24	18	14	6	13	NT	<i>qnrB</i>
Ec61	27/08/2012	F	CRF	<i>Escherichia coli</i>	23	35	26	27	30	6	22	28	22	18	6	30	NT	<i>qnrB / oqxAB</i>
Lac129	27/08/2012	F	CRF	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22	30	24	24	26	9	20	18	14	13	7	18	NT	<i>qnrB19 / oqxAB</i>

* De acordo com CLSI.^(31,32)

Local: estabelecimento comercial onde foi obtida a amostra de carne.

AK: amicacina; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; C: cloranfenicol; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; CN: gentamicina; CTX: cefotaxima; EFT: ceftiofur; ENO: enrofloxacina; FOS: fosfomicina; FOX: cefoxitina; NA: ácido nalidíxico; TE: tetraciclina.

NR: teste não realizado ou inconclusivo. NT: antibiótico não testado. “Mesma cepa”: cepas com o mesmo perfil de ERIC-PCR.

R: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano (números marcados em vermelho); S: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano (números marcados em preto); valores intermediários a R e S indicam resistência intermediária ao antimicrobiano (números marcados em verde).

4.2. Suscetibilidade aos antimicrobianos

4.2.1. Isolamento bacteriano

Foi prevista a pesquisa de genes de resistência à β lactâmicos e quinolonas em *E. coli* e *Salmonella* isoladas carne resfriada bovina (CRB), carne resfriada de frango (CRF) e carne resfriada suína (CRS). Entretanto, no decorrer do estudo esta proposta foi alterada e outras espécies de Enterobacteriaceae foram incluídas. Esta alteração foi realizada por duas razões:

- i) Desde as primeiras análises microbiológicas, obteve-se um baixo número de *E. coli* e *Salmonella* isolados, e este padrão se manteve ao longo do estudo.
- ii) Foram isoladas outras espécies de Enterobacteriaceae que podem causar infecções e/ou atuar como reservatórios para genes de resistência transmitidos horizontalmente para diversas espécies de bactérias patogênicas ou comensais no trato gastrointestinal humano. Entre elas destacam-se *K. pneumoniae*, que é um importante patógeno hospitalar e comunitário, e *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, que podem causar infecções extraintestinais após translocar-se do TGI para outros sítios corporais.⁽⁸⁷⁾ Estas bactérias têm sido isoladas a partir de amostras de carnes,⁽²²⁾ e a emergência na comunidade nos últimos anos de cepas de *E. coli* e *Klebsiella* spp. uropatogênicas multirresistentes têm estimulado a discussão sobre o papel dos alimentos de origem animal como reservatório para bactérias resistentes causadoras de infecções extraintestinais.^(14,112)

Durante o estudo, 420 isolados bacterianos foram obtidos das amostras de CRF, CRS e CRB analisadas. Entretanto, destes, nove isolados foram identificados como *Salmonella* spp., sendo todos isolados de CRS: sete da primeira amostra e dois da quarta amostra.

Suínos são importantes reservatórios de *Salmonella* spp. que podem ser transmitidas para humanos através da cadeia alimentar.⁽⁹⁰⁾ Apesar de as carnes de frango e bovina serem também reconhecidos reservatórios de *Salmonella* spp., neste estudo, nenhuma *Salmonella* spp. foi isolada a partir de CRF ou CRB. Com relação a *E. coli*, foram identificados doze isolados em CRF e nove em CRS. Nenhuma *E. coli* foi identificada em CRB.

Os “Métodos Oficiais para Análises Microbiológicas em Alimentos de Origem Animal”, recomendados pelo MAPA (referenciados na proposta inicial) e os métodos recomendados pelo “Bacteriological Analytical Methods” do FDA-USA (<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>)⁽⁴⁶⁾ foram aplicados. Esta estratégia foi usada porque o objetivo inicial era a recuperação de *E. coli* e *Salmonella* das amostras de carnes.

As 420 colônias bacterianas foram inicialmente identificadas como Enterobacteriaceae de forma presuntiva, pelo crescimento nos meios de cultura seletivos utilizados (ágar MacConkey, ágar EMB, ágar Entérico de Hectoen, ágar Bismuto Sulfito e ágar XLD). Alguns isolados, presuntivamente identificados como *E. coli* ou como *Salmonella* nos meios seletivos foram posteriormente identificados pelo sistema Vitek 2 (BioMerieux, França) como outras espécies de Enterobacteriaceae.

Entre os 420 isolados bacterianos coletados, 122 foram originados de CRS, 90 de CRB e 208 de CRF.

4.2.2. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

Todos os 420 isolados foram submetidas ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão, de acordo com as recomendações do CLSI.⁽³²⁾ Os resultados são mostrados no **Anexo 1**.

A **Tabela 2** mostra o número total e a porcentagem de bactérias resistentes à cefalosporinas de terceira geração e às quinolonas. Ao todo, 75 isolados (17,86%) apresentaram resistência (R) ou resistência intermediária (I) a alguma cefalosporina de terceira geração, e 125 (29,76%), apresentaram resistência ou resistência intermediária a alguma quinolona.

Tabela 2. Bactérias resistentes à cefalosporinas de terceira geração e às quinolonas em CRS, CRF e CRB.

Carne	(R/I) a cefalo. 3ª g.	(R/I) a quinolonas
CRS	27/122 (22,13%)	43/122 (35,24%)
CRF	20/208 (9,61%)	63/208 (30,29%)
CRB	28/90 (31,11%)	19/90 (21,11%)
Total	75/420 (17,86%)	125/420 (29,76%)

CRS: Carne Resfriada Suína; CRF: Carne Resfriada de Frango; CRB: Carne Resfriada Bovina.

A **Figura 2** mostra o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos entre as 122 Enterobacteriaceae isoladas de CRS. Ao todo, 89 isolados bacterianos apresentaram resistência ou resistência intermediária a pelo menos um antimicrobiano da classe dos β -lactâmicos. Com relação às cefalosporinas de terceira geração, foram observados os seguintes resultados:

- 10 isolados apresentaram resistência e 12 resistência intermediária ao ceftiofur;

- 5 isolados apresentaram resistência e 9 resistência intermediária à cefotaxima;
- 2 isolados apresentaram resistência e 4 resistência intermediária à ceftazidima;
- 5 apresentaram resistência e 3 resistência intermediária à ceftriaxona.

Com relação às quinolonas, foram observados os seguintes resultados:

- 32 isolados apresentaram resistência e 7, resistência intermediária ao ácido nalidíxico;

- 18 apresentaram resistência e 4, resistência intermediária à levofloxacina;
- 22 apresentaram resistência e 1, resistência intermediária à ofloxacina;
- 23 apresentaram resistência e 9, resistência intermediária à moxifloxacina;
- 20 apresentaram resistência e 1, resistência intermediária a ciprofloxacina;
- 21 apresentaram resistência e 10, resistência intermediária à enrofloxacina.

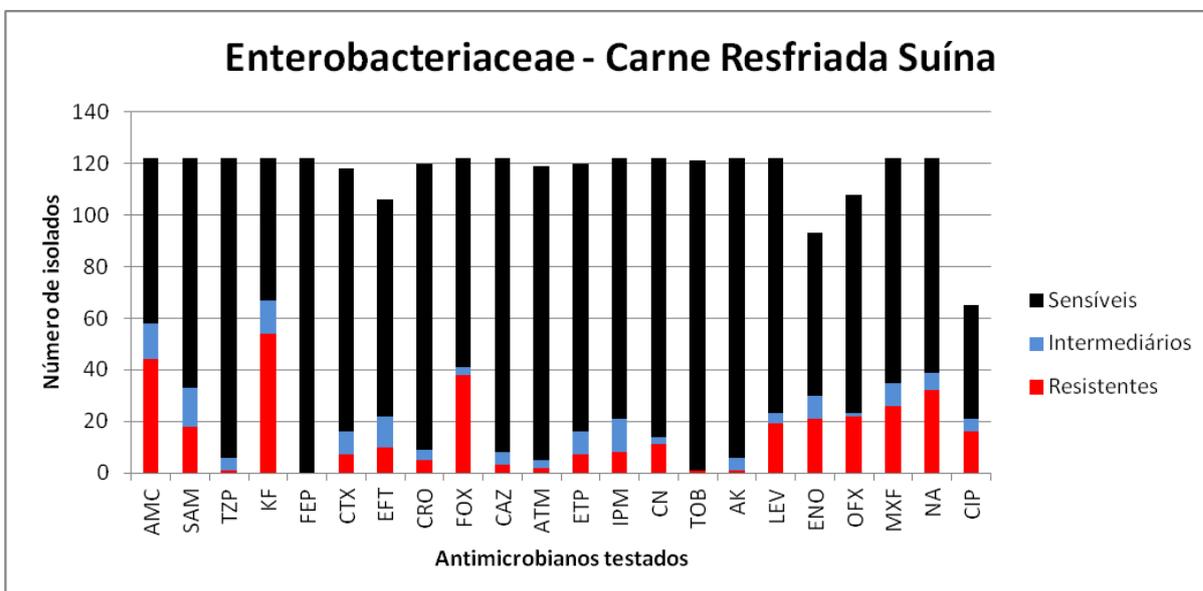


Figura 2. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, observado entre as Enterobacteriaceae isoladas de CRS.

A **Figura 3** mostra o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, observado entre as 208 Enterobacteriaceae isoladas de CRF. Com relação às cefalosporinas de terceira geração, foram observados os seguintes resultados:

- 10 isolados apresentaram resistência e 8, resistência intermediária ao ceftiofur;
- 14 isolados apresentaram resistência e 4, resistência intermediária à cefotaxima;
- 8 isolados apresentaram resistência e 4, resistência intermediária à ceftazidima;
- 10 apresentaram resistência e 1, resistência intermediária à ceftriaxona.

Com relação às quinolonas, foram observados os seguintes resultados:

- 36 isolados apresentaram resistência e 11, resistência intermediária ao ácido nalidíxico;
- 2 isolados apresentaram resistência e 1, resistência intermediária à levofloxacina;
- 1 isolado apresentou resistência e 1, resistência intermediária à ofloxacina;
- 13 isolados apresentaram resistência e 1, resistência intermediária à moxifloxacina;
- 18 isolados apresentaram resistência e 17, resistência intermediária à enrofloxacina.

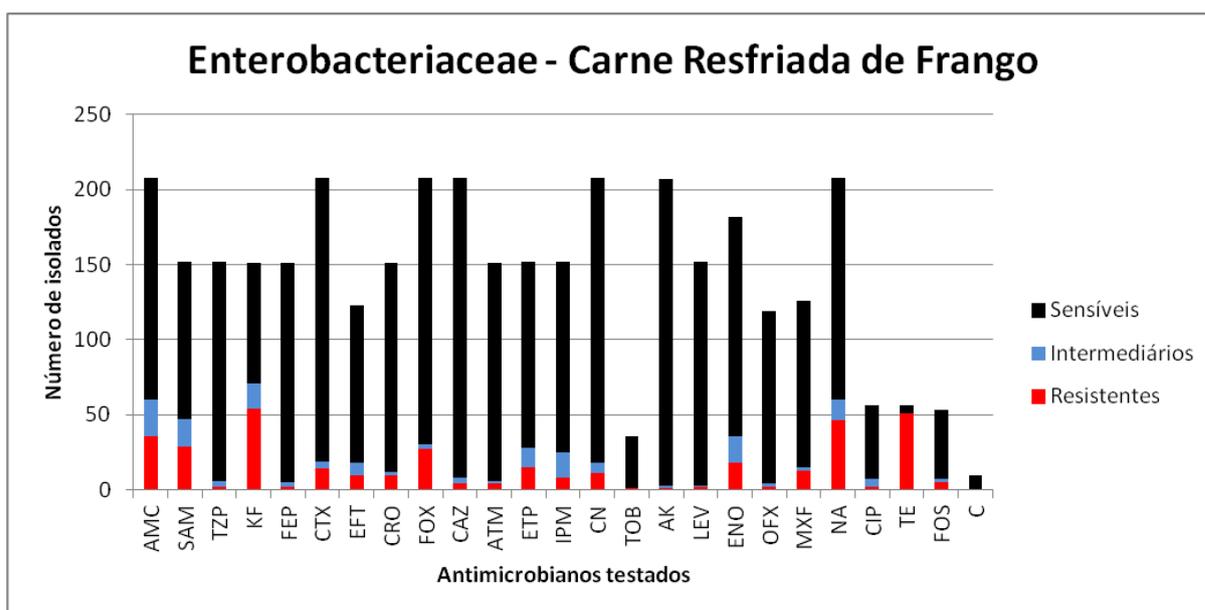


Figura 3. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos observado entre as Enterobacteriaceae isoladas de CRF.

A **Figura 4** mostra o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, observado entre as 90 Enterobacteriaceae isoladas de CRB.

Com relação às cefalosporinas de terceira geração, foram observados os seguintes resultados:

- 11 isolados apresentaram resistência e 5, resistência intermediária ao ceftiofur;
- 10 isolados apresentaram resistência e 7, resistência intermediária à cefotaxima;
- 12 isolados apresentaram resistência e 6, resistência intermediária à ceftazidima;
- 9 isolados apresentaram resistência à ceftriaxona.

Com relação às quinolonas, foram observados os seguintes resultados:

- 4 isolados apresentaram resistência e 8, resistência intermediária ao ácido nalidíxico;

- 2 apresentaram resistência intermediária à ofloxacina;
- 1 isolados apresentaram resistência e 5, resistência intermediária à moxifloxacina;
- 6 isolados apresentaram resistência e 1, resistência intermediária à enrofloxacina.

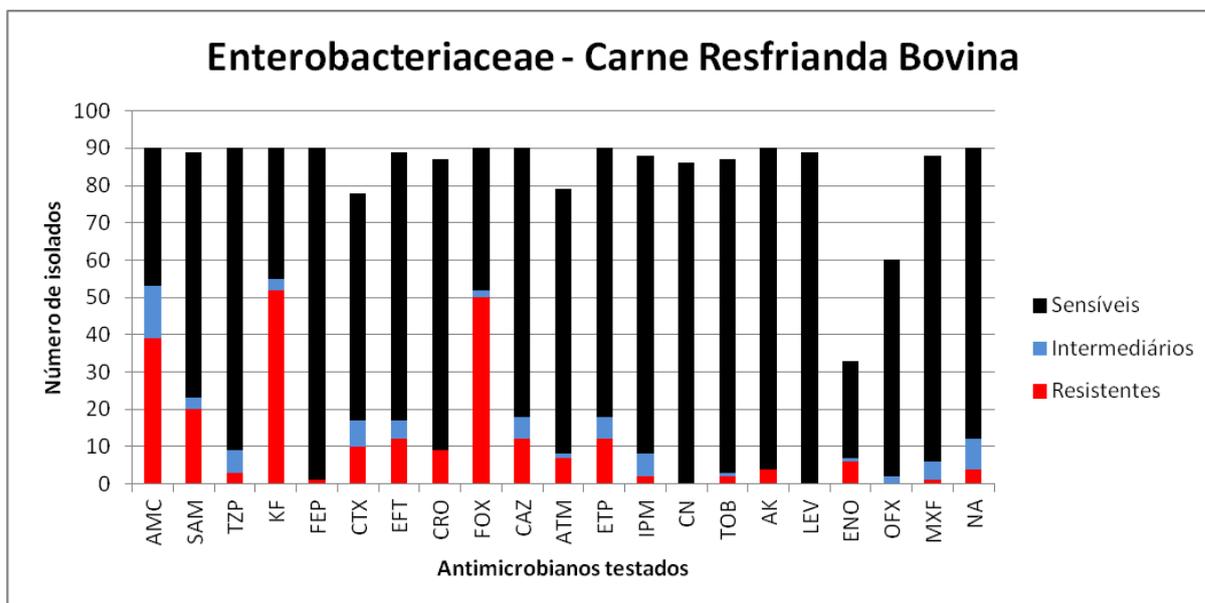


Figura 4. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos observado entre Enterobacteriaceae isoladas de CRB.

Entre as 420 Enterobacteriaceae avaliadas, observamos 31 isolados, de diversas espécies (**Anexo 1**), resistentes ao ceftiofur, uma cefalosporina de terceira geração, de uso exclusivo em animais, considerado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como criticamente importante para a medicina veterinária. No Brasil, o ceftiofur é utilizado tanto na suinocultura como na bovinocultura e avicultura.^(117,167)

Diversos estudos têm demonstrado o impacto da pressão seletiva causada pelo uso do ceftiofur na seleção de cepas resistentes não somente a este antimicrobiano, mas também a outras cefalosporinas de terceira geração importantes em medicina humana,⁽¹⁷⁷⁾ tais como a cefotaxima, ceftazidima, e ceftriaxona, como tem sido demonstrado em estudos envolvendo suínos,⁽¹⁰⁷⁾ gado bovino,⁽¹⁵⁴⁾ e aves de corte.⁽¹³³⁾ Assim, a possibilidade de que a presença de Enterobacteriaceae resistentes ao ceftiofur e a outras cefalosporinas

nas amostras de carne avaliadas seja decorrente do uso deste antimicrobiano deve ser considerada.

Neste estudo observamos um número maior de isolados resistentes à quinolonas do que a cefalosporinas de terceira geração, principalmente entre as Enterobacteriaceae isoladas de CRF e CRS. Entre as 208 Enterobacteriaceae isoladas de CRF, 34 apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e 11 a enrofloxacin. Entre as 122 Enterobacteriaceae isoladas de CRS, 32 apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e 21 a enrofloxacin. Estes dados sugerem que o amplo uso de enrofloxacin no Brasil,⁽¹⁰³⁾ inclusive no estado de São Paulo,⁽⁹⁸⁾ possa ser um fator de seleção de bactérias resistentes a quinolonas.

A enrofloxacin pode facilitar o desenvolvimento de resistência cruzada a diferentes quinolonas e fluoroquinolonas, assim, a resistência a ciprofloxacina (testada apenas para alguns isolados de CRS), levofloxacina, oxifloxacina e moxifloxacina encontrada em várias Enterobacteriaceae neste estudo podem ser decorrentes de seleção cruzada, já que estes antimicrobianos não são usados em animais.

Todas as Enterobacteriaceae que apresentaram resistência ou resistência intermediária às cefalosporinas de terceira geração e ao cefepime foram incluídas nos testes para detecção de genes de resistência. A mesma abordagem foi adotada para isolados resistentes ou com resistência intermediária ao ácido nalidíxico ou qualquer uma das fluoroquinolonas testadas, sendo todos incluídos nos testes para detecção de genes de resistência as quinolonas. Os resultados são apresentados a seguir.

4.3. Detecção de genes responsáveis pela resistência aos beta-lactâmicos e às quinolonas

As Enterobacteriaceae que apresentaram resistência ou resistência intermediária a alguma cefalosporina de terceira geração (75 isolados) e resistência ou resistência intermediária a alguma quinolona (125 isolados) foram submetidos a PCR com primers e protocolos específicos (**Quadros 1 e 2**) para a detecção dos genes de resistência. Os resultados são mostrados a seguir.

4.3.1. Genes de resistência aos β -lactâmicos

Após a análise dos perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos apresentados pelos 420 isolados do estudo, em 22 (5,24%) foram detectados genes de resistência às drogas β -lactâmicas (genes *bla*). Destas 22 cepas, doze (54,54%) apresentaram *bla*_{SHV} (S36, S51, S68, S105, S116, S205, Ec45, Lac11, Lac87, Lac88, Lac98 e Lac106), cinco cepas (22,73%) apresentaram *bla*_{TEM} (S88, S105, S137, Lac55 e Lac106) e cinco cepas (22,73%) apresentaram *bla*_{CTX-M} (S11, S105, S137, Ec32 e Lac60).

4.3.1.1. Detecção e caracterização de *bla*_{SHV}

Em 12 isolados foram detectados genes *bla*_{SHV}, sendo seis detectados em CRS, três em CRF e três em CRB.

As **Figuras 5, 6 e 7** demonstram a detecção do gene *bla*_{SHV} nas cepas S36, S51, S68, S105, S116, S205, Ec45, Lac11, Lac87, Lac88, Lac98 e Lac106, através da visualização do fragmento de 861 pb, correspondente à região codificadora do gene, e a **Tabela 3** mostra o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dessas cepas. Apesar de as

cepas S36 (*Citrobacter youngae*), S51 (*C. youngae*) e Lac11 (*Citrobacter freundii*) apresentarem duas bandas inespecíficas além da banda de 861 pb (**Figura 5**), as mesmas foram consideradas carreadoras de *bla*_{SHV} pelo fato de a banda esperada se apresentar fortemente no gel de agarose, indicando grande quantidade deste “amplicon” na amostra. Já as cepas S68 (*C. freundii*), S205 (*K. pneumoniae*), Lac87 (*K. pneumoniae*), Lac88 (*K. pneumoniae*), Lac98 (*K. pneumoniae*) e Lac106 (*E. coli*) apresentam, nitidamente, uma única banda com o tamanho esperado, e a cepa Ec45 (*Enterobacter cloacae*) apresenta uma banda de 861 pb fraca no gel, porém única, sendo considerada também como positiva na detecção deste gene. Já as cepas S105 e S116, ambas *Klebsiella pneumoniae*, apresentaram a banda correspondente ao gene *bla*_{SHV} na multiplex-PCR, embora a banda de S116 esteja muito mais nítida que a de S105, talvez, mesmo, pelo fato de a primeira ter amplificado um único gene, enquanto a segunda tenha amplificado três diferentes genes (**Figura 6**).

O sequenciamento do *bla*_{SHV} detectado nas cepas S105 e Lac98 revelou tratar-se de *bla*_{SHV-11}, que codifica uma β-lactamase diferente de SHV-1 por apenas uma substituição de leucina por glutamina na posição 35,⁽¹²⁵⁾ e apresenta um espectro restrito,⁽¹²⁰⁾ assim como nas cepas S205, Lac87 e Lac88 foi identificado o gene *bla*_{SHV-1}, porém estes resultados não conferem para produção de ESBL, pois são genes com localização cromossômica em *K. pneumoniae* e codificam uma beta-lactamase de espectro restrito.^(99,120) Na cepa S116, detectada em uma *K. pneumoniae* isolada de CRF, identificou-se o gene *bla*_{SHV-2}, que codifica SHV-2, a primeira ESBL descrita,⁽⁹³⁾ e atualmente encontra-se mundialmente disseminado entre diferentes espécies de Enterobacteriaceae isoladas de espécimes clínicos humanos.⁽¹⁰¹⁾ SHV-2 diferencia-se de SHV-1 por apenas uma substituição de glicina por serina na posição 238, e confere resistência a todas as cefalosporinas de amplo espectro e ao aztreonam,⁽⁷⁷⁾ embora S116 apresente suscetibilidade a este último. Já a cepa Lac106 não teve um resultado conclusivo no sequenciamento para identificar a variante (**Tabela 3**).

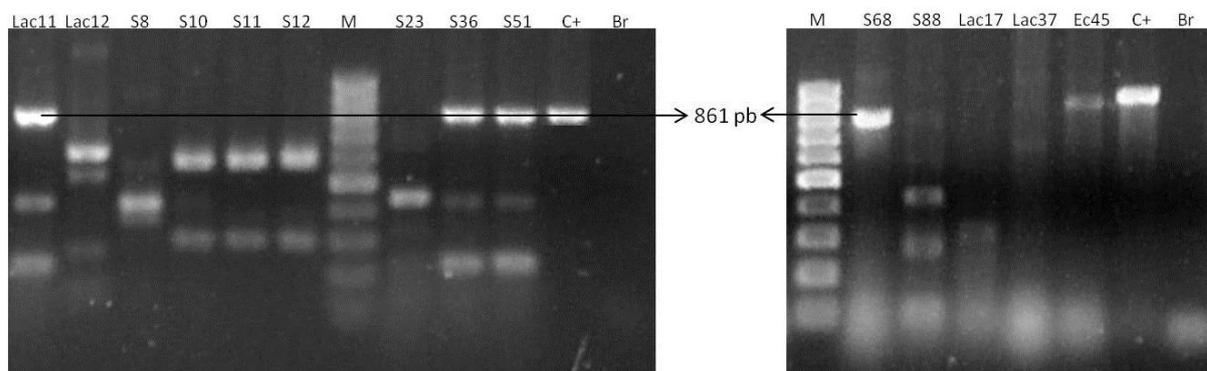


Figura 5. Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene *bla*_{SHV}. [M: marcador de peso molecular de 100 pb. C+: controle positivo da reação. Br: controle negativo da reação.]

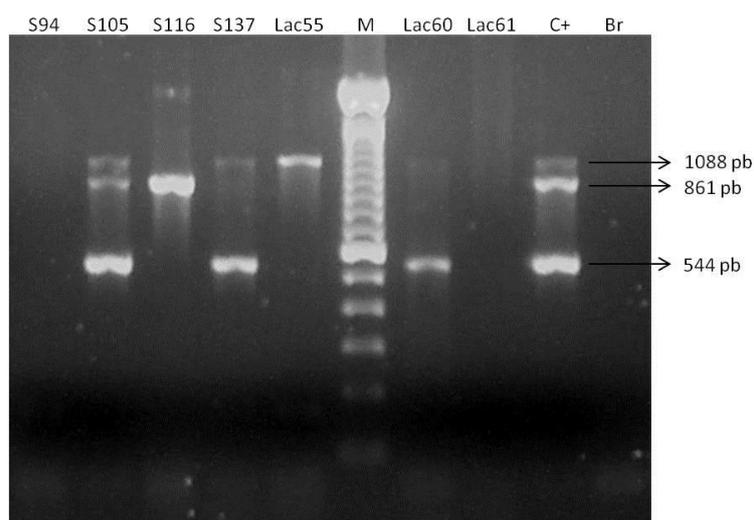


Figura 6. Gel de eletroforese da multiplex-PCR para detecção dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}. [M: marcador de peso molecular de 100 pb. C+: controle positivo da reação. Br: controle negativo da reação.]

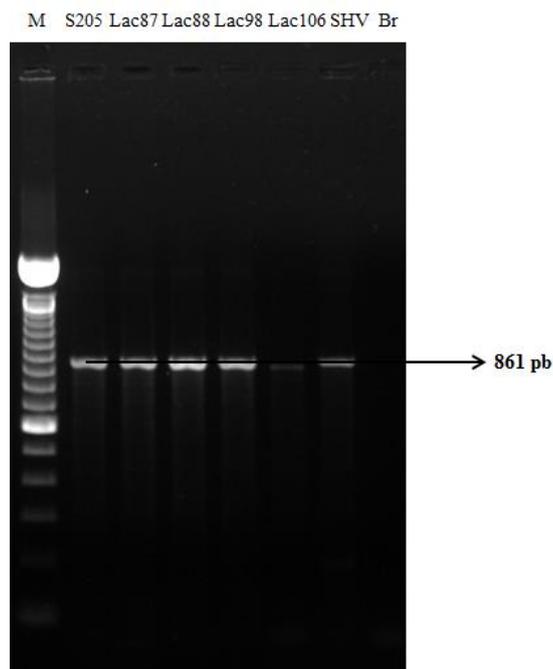


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à PCR para detecção do gene *bla_{SHV}*. [M: marcador de peso molecular de 1 kb; SHV: controle positivo para *bla_{SHV}* (861 pb); Br: controle negativo.]

Após a primeira detecção, os genes *bla_{SHV}* não amplificaram, novamente, nas cepas S23, S36, S51, S68, Ec45 e Lac11, o que inviabilizou seu sequenciamento.

As seis cepas que tiveram o seu *bla_{SHV}* sequenciado (S105, S116, S205, Lac87, Lac88 e Lac98) foram identificadas como *K. pneumoniae*, reconhecida como um importante agente de infecções relacionadas à assistência à saúde e comunitárias, além de ser considerada o principal reservatório de genes de resistência dentre as Enterobacteriaceae. Esta bactéria coloniza os tratos respiratório e intestinal de humanos e causa pneumonia, bacteremia e meningite.⁽¹⁰²⁾ Recentemente, esta bactéria tem emergido como um importante patógeno causador de abscessos hepáticos piogênicos primários,⁽¹²⁹⁾ e algumas cepas têm sido relacionadas a infecções intestinais e diarreia em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos.⁽¹⁷⁰⁾

Dessa maneira, a detecção de *bla*_{SHV-2} em carne de frango, na qual foi previamente descrita em *K. pneumoniae* isolada em Portugal,⁽¹⁰⁹⁾ e em *E. coli* isoladas na Holanda,⁽¹⁶⁹⁾ tem relevância, apesar de ser um dado isolado, mas acredita-se que este é o primeiro relato (S116) da detecção de *K. pneumoniae* carreadora de *bla*_{SHV-2} em carne no Brasil.

A detecção de genes da família *bla*_{SHV} em diversas Enterobacteriaceae isoladas de animais de produção tem sido descrita, tal como em *E. coli* isoladas de animais doentes na Espanha;⁽¹³⁾ em amostras fecais de porcos na China e na Espanha;^(13,173) em cepas de *E. coli* em amostras de carne na Tunísia,⁽⁸⁵⁾ e em carne de frango na Holanda;⁽¹⁰¹⁾ e cepas de *Salmonella* em amostras de aves e de suas carnes na Holanda.⁽⁷¹⁾

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados S36, S51, S68 e Ec45, sugere a produção de ao menos uma ESBL (**Tabela 3**). Pelo fato de não terem sido detectados outros genes nestes isolados, provavelmente os *bla*_{SHV} detectados são codificadores de ESBL, e o sequenciamento dos mesmos elucidará a questão.

Tabela 3. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene *bla*_{SHV}.

Antimicrobianos	Identidade					
	<i>P. mirabilis</i> S36	<i>K. pneumoniae</i> S51	<i>K. pneumoniae</i> S68	<i>E. coli</i> S105	<i>E. coli</i> S116	<i>K. pneumoniae</i> S205
AMC (13/18)	6	11	6	14	15	20
SAM (11/15)	8	20	6	6	13	16
TZP (17/21)	20	25	18	20	18	24
KF (14/18)	6	14	6	6	6	19
FEP (14/18)	30	34	26	13	16	30
CTX (22/26)	11	6	14	10	14	28
EFT (19/23)	11	6	9	9	12	22
CRO (19/23)	12	10	10	9	13	30
FOX (14/18)	8	6	6	25	24	24
CAZ (17/21)	11	29	6	20	17	24
ATM (17/21)	18	34	17	17	22	29
ETP (19/23)	28	34	18	22	22	27
IPM (19/23)	24	26	24	26	29	29
CN (12/15)	23	23	23	10	18	12
TOB (12/15)	24	24	18	NT	NT	19
AK (14/17)	24	23	23	20	20	18
LEV (13/17)	32	23	29	20	24	18
ENO (15/21)	NT	NT	28	16	24	17
OFX (12/16)	30	23	30	18	NT	17
MXF (16/20)	28	20	28	16	NT	15
NA (13/19)	24	19	23	16	22	18
CIP = 16 µg/ml*	NT	NT	NT	NT	NT	0,5*
CIP (15/21)	NT	NT	NT	NT	NT	NT

NT: antimicrobiano não testado. Números marcados em vermelho: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano testado. Números marcados em preto: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano testado. Números marcados em verde: tamanho do halo que indica resistência intermediária ao antimicrobiano testado.

Tabela 3 (continuação). Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene *bla_{SHV}*.

Antimicrobianos	Identidade					
	<i>E. cloacae</i> Ec45	<i>C. freundii</i> Lac11	<i>K. pneumoniae</i> Lac87	<i>K. pneumoniae</i> Lac88	<i>K. pneumoniae</i> Lac98	<i>E. coli</i> Lac106
AMC (13/18)	6	6	20	20	19	18
SAM (11/15)	8	18	17	18	16	18
TZP (17/21)	18	26	24	24	18	25
KF (14/18)	6	12	20	19	18	15
FEP (14/18)	22	32	28	26	24	29
CTX (22/26)	7	30	24	24	24	NT
EFT (19/23)	7	NT	22	18	22	20
CRO (19/23)	10	30	30	29	29	24
FOX (14/18)	10	6	24	22	20	24
CAZ (17/21)	10	24	26	25	24	27
ATM (17/21)	14	28	30	28	26	27
ETP (19/23)	16	20	30	28	24	30
IPM (19/23)	26	NT	26	30	26	28
CN (12/15)	23	20	10	18	18	19
TOB (12/15)	23	20	18	18	21	21
AK (14/17)	20	22	18	18	18	20
LEV (13/17)	29	26	18	25	25	14
ENO (15/21)	26	6	18	28	26	10
OFX (12/16)	27	NT	17	25	21	12
MXF (16/20)	28	24	14	22	24	9
NA (13/19)	24	18	17	23	24	6
CIP = 16 µg/ml*	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CIP (15/21)	NT	NT	19	28	26	14

NT: antimicrobiano não testado. Números marcados em vermelho: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano testado. Números marcados em preto: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano testado. Números marcados em verde: tamanho do halo que indica resistência intermediária ao antimicrobiano testado.

4.3.1.2. Detecção e caracterização de *bla_{TEM}*

Genes da família *bla_{TEM}* foram encontrados em cinco isolados, entre as 420 Enterobacteriaceae obtidas de CRF, CRS e CRB. Destes, 2 foram detectados em CRS e 3 em CRF. O gene *bla_{TEM-1}* foi detectado nas cinco cepas S88 (*C. youngae*), S105 (*K. pneumoniae*), S137 (*Escherichia coli*), Lac 55 (*E. coli*) e Lac106 (*E. coli*) (**Figuras 6, 8 e 9**).

Os isolados carreadores de *bla*_{TEM-1} apresentam resistência a cefalosporinas de terceira geração. Acreditamos que produção de outra (s) enzima (s) pode ser responsável por este perfil de resistência, e de fato, S105 e S137 apresentaram *bla*_{CTX-M-2}, como descrito abaixo. TEM-1 é uma β -lactamase de espectro restrito amplamente disseminada, frequentemente detectada em bactérias isoladas de amostras clínicas humanas. Nos últimos anos, a produção de β -lactamases tipo TEM por bactérias isoladas de animais de produção tem sido relatada, como em *P. mirabilis* isolados de produtos cárneos, em *E. coli* isoladas de bezerros com doença diarreica,^(9,91) em vários sorotipos de *S. enterica* isoladas de aves e humanos na Bélgica e França,⁽²⁹⁾ e em *E. coli* isoladas de carnes de frango na Holanda.⁽¹⁰¹⁾ Já em L106 o sequenciamento foi inconclusivo.

Dois isolados de *E. coli* que apresentaram o gene *bla*_{TEM-1}, bem como o isolado de *C. youngae*, foram recuperados de uma mesma amostra de CRF (**Tabela 4**) e, embora esse gene não seja causador de um perfil de resistência às cefalosporinas de terceira geração, sua presença em cepas possivelmente patogênicas isoladas de alimentos é preocupante pelo fato de este gene poder sofrer mutações que resultem na expressão de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs).

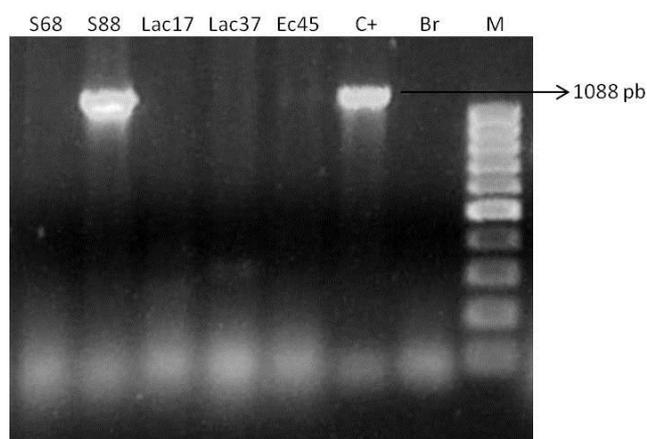


Figura 8. Gel de eletroforese da PCR para detecção do gene *bla*_{TEM}. [M: marcador de peso molecular de 100 pb. C+: controle positivo da reação. Br: controle negativo da reação.]

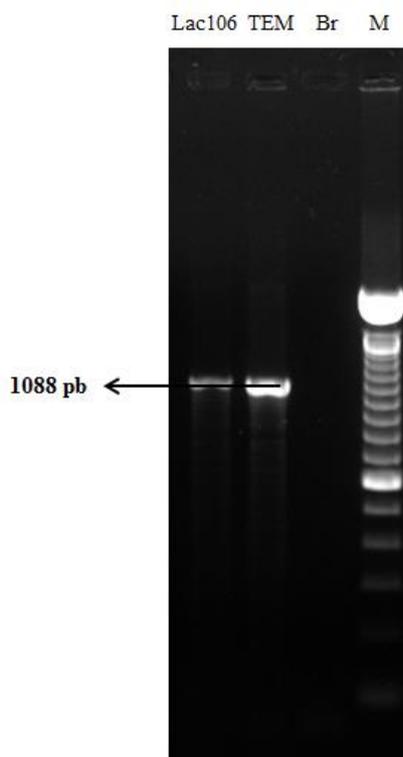


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à PCR para detecção do gene *bla*_{TEM}. [M: marcador de peso molecular de 1 kb; TEM: controle positivo para *bla*_{TEM} (1088 pb); Br: controle negativo.]

Os perfis de suscetibilidade dos quatro isolados sequenciados, nos quais *bla*_{TEM} foi detectado sugerem a expressão de ESBL (**Tabela 4**), pois apresentam resistência a cefalosporinas de terceira geração, como a cefotaxima e a ceftriaxona. De acordo com o CLSI,⁽³²⁾ cepas que apresentam resistência às cefalosporinas de terceira geração são consideradas como produtoras de ESBL. Porém, a enzima TEM-1, codificada pelo gene *bla*_{TEM-1} identificado em S88, S105, S137 e Lac55, não é uma ESBL. Assim, outra enzima deve ser a responsável por estes perfis de resistência. Em S105 e S137 foi detectado um gene *bla*_{CTX-M} (ver seção **4.3.1.3**), o que explica o perfil de resistência destes isolados, porém em S88 e Lac55 não foi detectado nenhum outro gene, sugerindo a existência de outros genes codificadores de ESBL que ainda não foram testados.

Tabela 4. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene *bla*_{TEM}.

Antimicrobianos	Identidade				
	<i>C. youngae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
	S88	S137	S105	Lac55	Lac106
AMC (13/18)	6	16	14	14	18
SAM (11/15)	6	10	6	12	18
TZP (17/21)	18	26	20	23	25
KF (14/18)	6	6	6	6	15
FEP (14/18)	26	18	13	18	29
CTX (22/26)	6	15	10	16	NT
EFT (19/23)	9	14	9	NT	20
CRO (19/23)	8	14	9	14	24
FOX (14/18)	6	29	25	25	24
CAZ (17/21)	8	26	20	24	27
ATM (17/21)	14	21	17	22	27
ETP (19/23)	24	32	22	29	30
IPM (19/23)	24	32	26	26	28
CN (12/15)	22	22	10	20	19
TOB (12/15)	23	NT	NT	NT	21
AK (14/17)	23	22	20	20	20
LEV (13/17)	26	30	20	22	14
ENO (15/21)	23	30	16	16	10
OFX (12/16)	24	NT	18	18	12
MXF (16/20)	23	NT	16	16	9
NA (13/19)	22	22	16	10	6
CIP = 16 µg/ml*	NT	NT	NT	NT	NT
CIP (15/21)	NT	NT	NT	NT	14

NT: antimicrobiano não testado. Números marcados em vermelho: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano testado. Números marcados em preto: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano testado. Números marcados em verde: tamanho do halo que indica resistência intermediária ao antimicrobiano testado.

4.3.1.3. Detecção e caracterização de *bla*_{CTX-M}

As Figuras 10 e 11 mostram a amplificação do fragmento de 544 pb, comum em todos os *bla*_{CTX-M} descritos até o momento, nas cepas S11 (*Proteus mirabilis*), S105 (*K. pneumoniae*), S137 (*E. coli*), Ec32 (*C. diversus*) e Lac 60 (*E. coli*), todas provenientes de CRF. A Tabela 5 apresenta o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos destas cinco cepas. A cepa Lac3 (*K. pneumoniae*) apresentou uma banda de mesmo peso molecular, porém muito fraca no gel de agarose (Figura 11). Assim, foi também submetida ao teste

de RFLP, juntamente com as outras cinco cepas, para confirmar a presença de *bla*_{CTX-M} em Lac3, apesar de esta não apresentar perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos sugestivo da presença deste gene (**Tabela 5**).

O perfil de suscetibilidade apresentado pelas cinco cepas onde *bla*_{CTX-M} foi detectado também sugere a produção de ESBL, pois todos possuem resistência, ou mesmo resistência intermediária, a cefalosporinas de terceira geração (**Tabela 5**). Os isolados S11, S105 e Lac60 apresentam, inclusive, resistência ao cefepime, uma cefalosporina de quarta geração; e Ec32 apresenta resistência intermediária à cefotaxima e ao ceftiofur, porém a resistência intermediária é considerada como resistência, quando na prática clínica e na pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos.⁽³²⁾

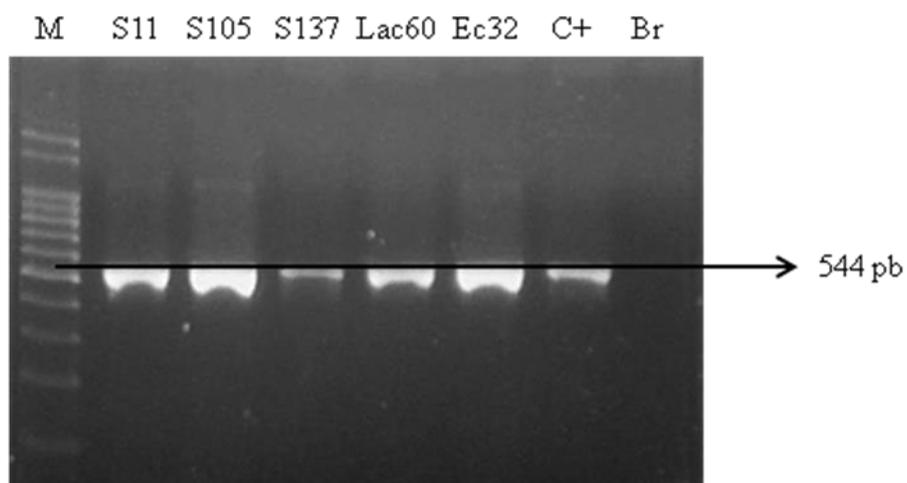


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à reação de PCR para detecção do gene *bla*_{CTX-M}. [M: marcador de peso molecular de 100 pb; C+: controle positivo; Br: controle negativo.]

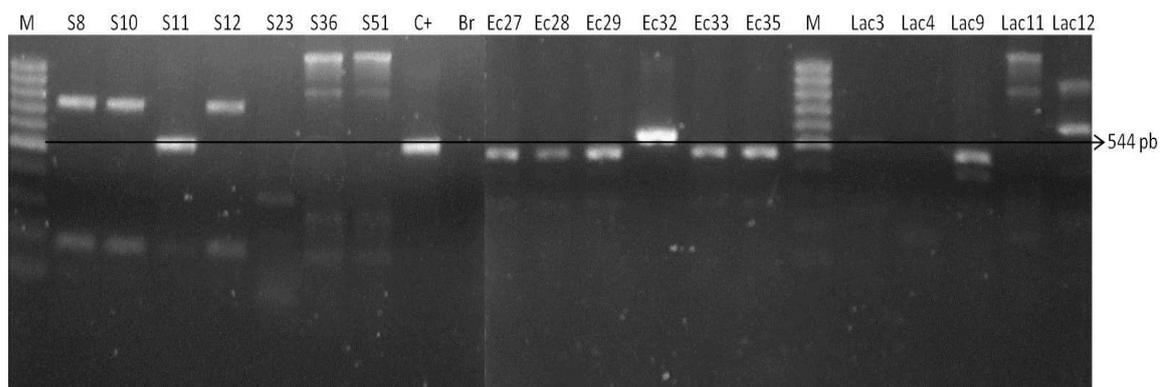


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à reação de PCR para detecção do gene *bla*_{CTX-M}. [M: marcador de peso molecular de 100 pb. C+: controle positivo da reação. Br: controle negativo da reação.]

A presença do gene *bla*_{CTX-M-2-like} foi confirmada em cinco Enterobacteriaceae isoladas de carne resfriada de frango, sendo duas *Escherichia coli* (Lac 60 e S137), uma *Klebsiella pneumoniae* (S105), um *Citrobacter diversus* (Ec32) e um *Proteus mirabilis* (S11), como mostra a **Figura 12**. Estes isolados apresentaram resistência, ou resistência intermediária a cefalosporinas de terceira geração, inclusive ao ceftiofur e também ao cefepime. As demais cepas submetidas à RFLP, inclusive a cepa Lac3, não apresentaram nenhum perfil de restrição conhecido para os grupos de *bla*_{CTX-M}. O sequenciamento identificou os cinco genes detectados como *bla*_{CTX-M-2}.

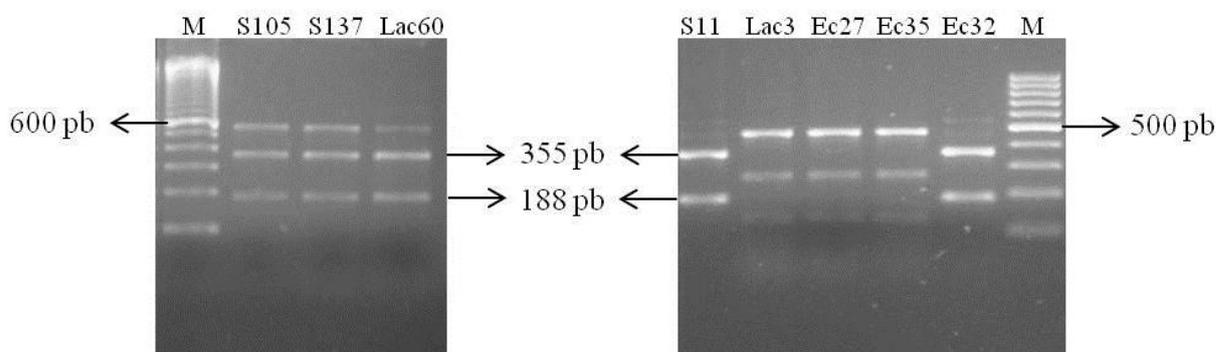


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 2% referente aos produtos da técnica de RFLP para detecção do grupo do gene *bla*_{CTX-M} nas cepas indicadas. [M: marcador de peso molecular de 100 pb.]

Assim como para os demais genes discutidos até o momento, existem poucos relatos na literatura sobre a detecção de *bla*_{CTX-M} em bactérias isoladas de carnes, havendo casos no Japão,⁽¹⁵⁸⁾ em *E. coli* isoladas de carcaças de gado; na França e Bélgica, em *Salmonella* isoladas de aves,^(7,30) e em *E. coli* e *Salmonella* isoladas de aves na Bélgica, França, Espanha e Guiana Francesa.⁽⁵³⁾

Tabela 5. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados onde foi detectado o gene *bla*_{CTX-M}.

Antimicrobianos	Identidade				
	<i>P. mirabilis</i> S11	<i>K. pneumoniae</i> S105	<i>E. coli</i> S137	<i>C. diversus</i> Ec32	<i>E. coli</i> Lac60
AMC (13/18)	13	14	16	13	18
SAM (11/15)	13	6	10	19	10
TZP (17/21)	25	20	26	25	28
KF (14/18)	6	6	6	12	6
FEP (14/18)	11	13	18	26	15
CTX (22/26)	11	10	15	24	10
EFT (19/23)	18	9	14	22	NT
CRO (19/23)	12	9	14	14	10
FOX (14/18)	21	25	29	7	28
CAZ (17/21)	24	20	26	26	24
ATM (17/21)	26	17	21	24	16
ETP (19/23)	16	22	32	12	30
IPM (19/23)	20	26	32	24	30
CN (12/15)	15	10	22	18	22
TOB (12/15)	18	NT	NT	19	NT
AK (14/17)	18	20	22	20	22
LEV (13/17)	19	20	30	30	20
ENO (15/21)	12	16	30	28	14
OFX (12/16)	14	18	NT	26	17
MXF (16/20)	10	16	NT	24	17
NA (13/19)	6	16	22	24	6

NT: antimicrobiano não testado. Números marcados em vermelho: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano testado. Números marcados em preto: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano testado. Números marcados em verde: tamanho do halo que indica resistência intermediária ao antimicrobiano testado.

Em todo o mundo, a disseminação de enzimas tipo CTX-M tem sido relacionada ao aumento da prevalência de Enterobacteriaceae produtoras de ESBL e neste contexto, os

alimentos são considerados uma potencial fonte, principalmente as carnes, como relatado no presente estudo, em que 100% dos genes codificadores de CTX-M identificados são *bla*_{CTX-M-2}, fato importante de se destacar já que as cepas foram isoladas a partir de carnes destinadas ao consumo humano. Enterobacteriaceae produtoras de CTX-M têm sido descritas em animais de produção, principalmente frangos,⁽¹²⁸⁾ e variantes de *bla*_{CTX-M} já foram detectadas em bactérias isoladas de carnes em diversos países.^(7,30,53) Em um estudo interessante realizado no Reino Unido por Warren e colaboradores⁽¹⁷⁹⁾ revelou-se que 40% das cepas de *E. coli* produtoras de ESBL, isoladas a partir de peitos de frango importados do Brasil eram produtoras de CTX-M-2.⁽¹⁷⁹⁾ Em 2009, Fernandes e colaboradores descreveram a detecção de *bla*_{CTX-M-2} em *Salmonella* Typhimurium isoladas de carne de frango no Brasil entre 2003 e 2004.

É interessante observar que o gene *bla*_{CTX-M-2}, reconhecido por disseminar facilmente,⁽¹⁴³⁾ e detectado neste estudo em *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter diversus* e *P. mirabilis* isoladas de carne de frango encontra-se amplamente distribuído entre Enterobacteriaceae isoladas de infecções em humanos no Brasil.^(28,39,119,175) De fato, estudos epidemiológicos têm demonstrado a correlação entre a presença de genes de ESBL em bactérias isoladas de carne de frango e a alta prevalência de infecções em humanos.⁽⁸⁴⁾

De acordo com Dutil e colaboradores,⁽⁴²⁾ a emergência de genes de ESBL em frangos está relacionada ao uso de ceftiofur. Estudo realizado por Cavaco e colaboradores⁽²⁴⁾ demonstrou que o uso de ceftiofur favoreceu também a seleção de *E. coli* carreadoras de *bla*_{CTX-M} em suínos. Na avicultura brasileira o ceftiofur é usado principalmente em pintos, para o tratamento de infecções por diversos patógenos Gram-positivos e Gram-negativos. Este antimicrobiano tem ampla distribuição em diferentes tecidos e órgãos, mas apresenta meia vida curta, sendo necessárias múltiplas aplicações para a manutenção dos níveis plasmáticos eficientes. Assim, é possível que a ocorrência de

Enterobacteriaceae carreadoras de *bla*_{CTX-M-2} em carne de frango seja decorrente do uso do ceftiofur nas granjas de produção.

Ainda não se conhece a dose mínima de bactérias carreadoras de ESBLs necessária para que ocorra uma transmissão eficiente para humanos,⁽¹⁶⁹⁾ e mais estudos são necessários para a elucidação da real prevalência de genes de ESBLs em diferentes espécies de Enterobacteriaceae isoladas de alimentos de origem animal.

Neste estudo, conduzido com um número limitado de amostras de alimentos, e 420 isolados bacterianos, foram detectadas seis diferentes Enterobacteriaceae (1,4%) carreadoras de genes de ESBLs, sendo todos obtidos apenas de três diferentes amostras de carnes de frango adquiridas em diferentes pontos de venda. Em outros estudos,^(94,128) foram encontradas taxas mais altas, mas os dados não podem ser comparados devido a diferenças na metodologia, como a análise de um número maior de amostras e o uso de meios seletivos contendo cefalosporinas, que favorecia apenas o isolamento de bactérias resistentes.

Este estudo será continuado e considera-se importante avaliar um número maior de amostras, mas os dados obtidos até este momento, mostrando a presença de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter diversus* e *P. mirabilis* carreadoras de *bla*_{CTX-M-2} e *K. pneumoniae* carreadoras de *bla*_{SHV-2} em carne de frango comercializadas em São José do Rio Preto são importantes pois indicam o potencial das carnes em atuarem como fonte de Enterobacteriaceae carreadoras de genes de ESBL. Interessantemente, em estudos conduzidos por nosso grupo de pesquisa, encontrou-se *K. pneumoniae* carreadoras de *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{SHV-2},⁽¹⁷⁵⁾ e *Pseudomonas aeruginosa* carreadoras de *bla*_{CTX-M-2}.⁽¹³⁸⁾ como agentes de infecções graves em pacientes admitidos em um hospital terciário do município. Mais estudos são essenciais para que se estabeleça uma rota de disseminação e a ligação epidemiológica entre estes isolados e genes de resistência, mas como discutido

anteriormente, o papel dos alimentos de origem animal como reservatório para bactérias produtoras de ESBL deve ser considerado.

Este resultado demonstra, novamente, a ampla disseminação de *bla*_{CTX-M-2} entre as Enterobacteriaceae e reforça a importância de programas de vigilância na cadeia produtiva de carnes no país, já que o Brasil é referência mundial no comércio de carnes, inclusive grande exportador de carnes de frango para a União Europeia.⁽¹¹⁾ A contaminação de carne produzida no Brasil com essas cepas é preocupante, pois, além de constituir um importante problema de saúde pública, pode, futuramente, afetar as relações comerciais do país.

4.3.2. Genes de resistência às quinolonas

4.3.2.1. Genes *qnrB*

Entre todos os genes plasmidiais de resistência às quinolonas investigados neste estudo, o gene *qnrB* foi detectado com maior frequência, sendo identificado em dez isolados bacterianos recuperados de amostras de CRF (um *Citrobacter youngae*, dois *C. freundii*, dois *K. pneumoniae* e cinco *E. coli*), em oito isolados de amostras de CRS (dois *C. freundii*, um *C. braakii*, três *K. pneumoniae* e duas *Salmonella* spp.) e em seis isolados de amostras de CRB (um *C. youngae*, dois *C. freundii* e três *C. braakii*) (**Figuras 13, 14 e 15**). De fato, o gene *qnrB* é descrito como o mais prevalente.⁽¹³⁷⁾

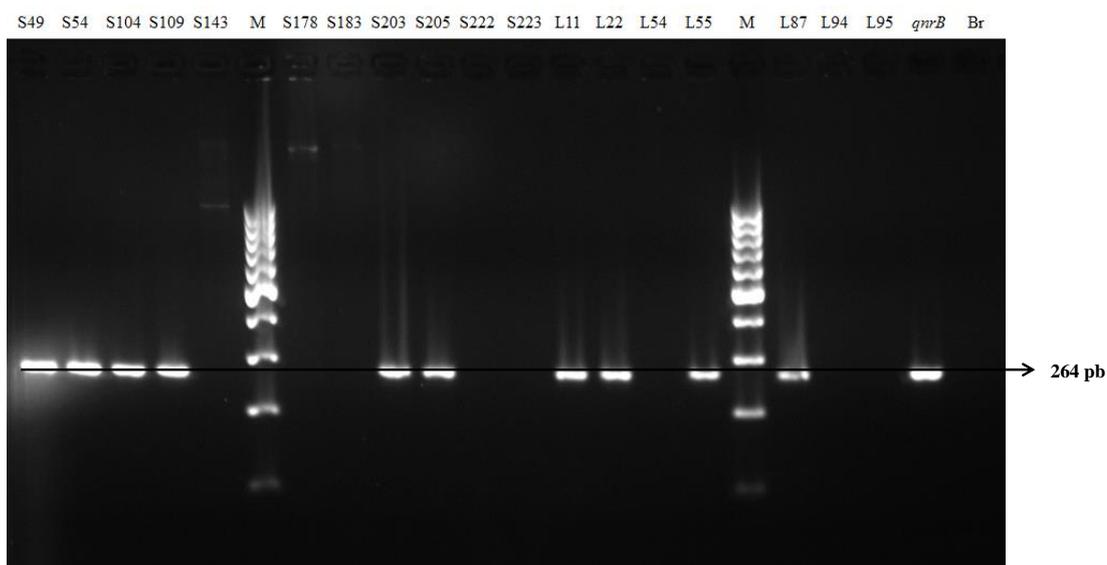


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 2% referente à reação de PCR para detecção do gene *qnr*. [M: marcador de peso molecular de 100 pb; *qnrB*: controle positivo; Br: controle negativo.]

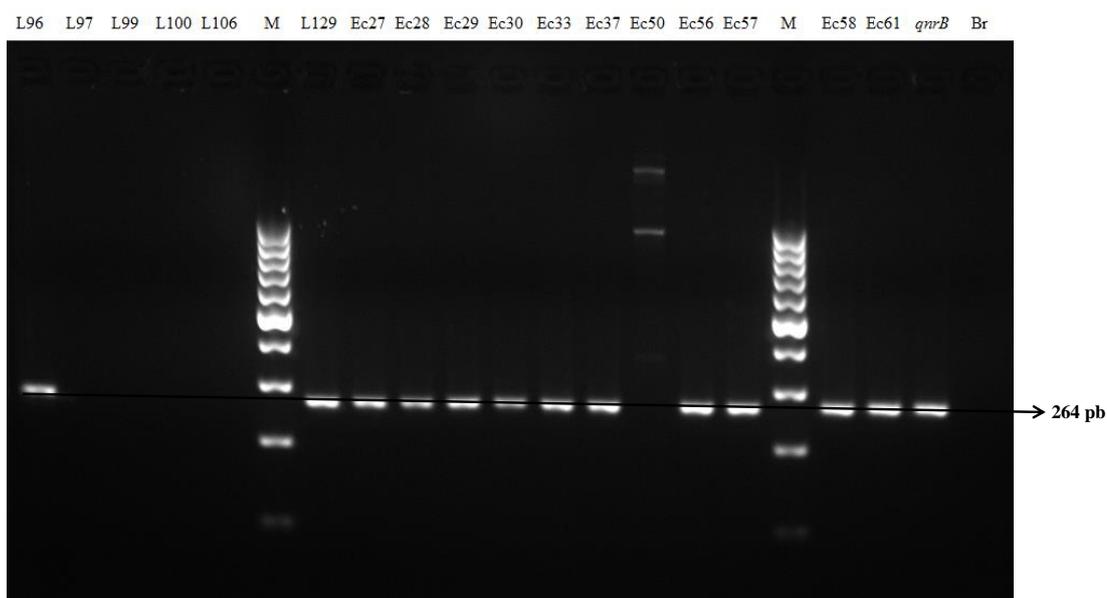


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 2% referente à reação de PCR para detecção do gene *qnr*. [M: marcador de peso molecular de 100 pb; *qnrB*: controle positivo; Br: controle negativo.]

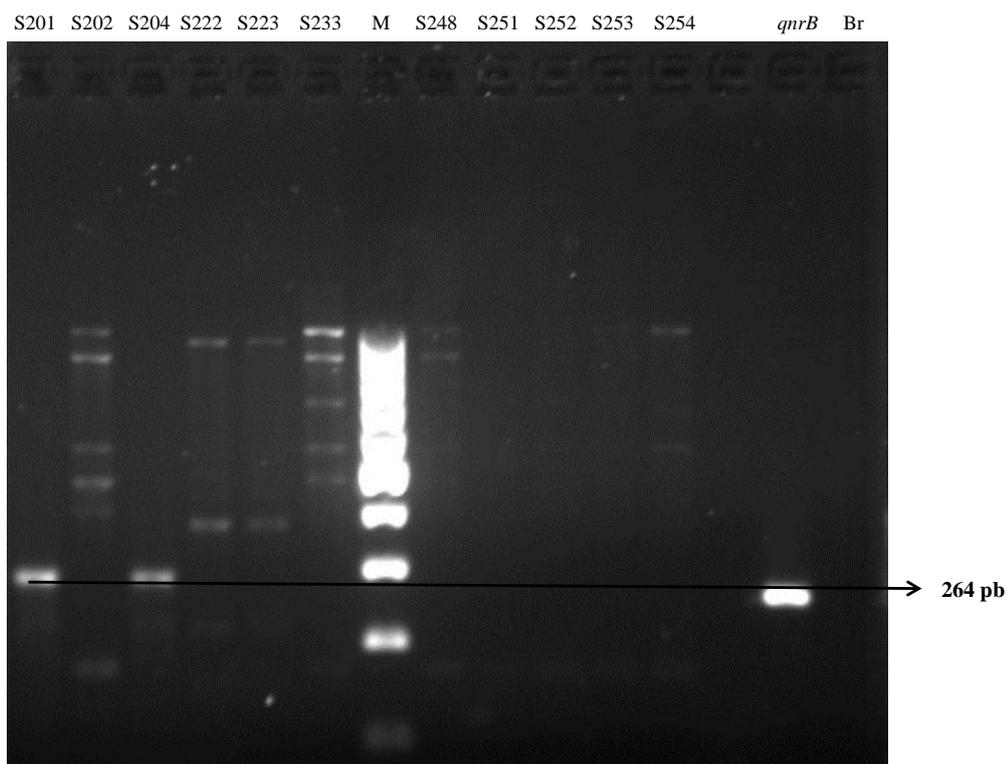


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 2% referente à reação de PCR para detecção do gene *qnr*. [M: marcador de peso molecular de 100 pb; *qnrB*: controle positivo; Br: controle negativo.]

Entre os 24 isolados em que *qnrB* foi detectado, 12 pertencem ao gênero *Citrobacter*. Este dado não é surpreendente, pois este gênero foi previamente descrito por Jacoby et al,⁽⁸⁰⁾ como reservatório de *qnrB*, onde apresentam localização cromossômica. Já em outras espécies de Enterobacteriaceae, variantes de genes *qnrB* estão localizadas em plasmídeos e associadas a integrons de classe 1.⁽⁶³⁾

Como discutido anteriormente, no Brasil a enrofloxacina é amplamente utilizada no manejo de animais de produção,^(98,103) favorecendo a seleção de bactérias resistentes à quinolonas, o que pode ter favorecido a seleção de Enterobacteriaceae carreadoras de *qnr*, como já descrito por Silva e Hollenbach,⁽¹⁵⁹⁾ e Ruiz e colaboradores.⁽¹⁴⁹⁾

Neste estudo, Enterobacteriaceae carreadoras de *qnrB* foram isoladas de três das quatro diferentes amostras de CRF, sendo as *E. coli* concentradas em duas amostras. Em CRS, isolados carreadores de *qnrB* também foram encontrados em três das quatro

diferentes amostras. Já em CRB, apenas uma amostra apresentou Enterobacteriaceae carreadoras de *qnrB*, sendo todas elas espécies de *Citrobacter*.

Foi observado que vários isolados carreadores de *qnrB* apresentaram apenas resistência ou resistência intermediária ao ácido nalidíxico, sendo sensíveis às demais fluoroquinolonas testadas (**Anexo 1**). Este resultado é esperado, pois a ação das proteínas Qnr, que protegem a DNA girase da ação das quinolonas, resulta apenas em baixo nível de resistência às quinolonas. Sua principal importância está relacionada ao favorecimento da seleção de bactérias que apresentam mutações no gene *gyrA* (que codifica a DNA girase), que promovem altos níveis de resistência a estes antimicrobianos.⁽⁵¹⁾

Entre as cinco *E. coli* carreadoras de *qnrB* isoladas de CRF, quatro apresentaram resistência intermediária ao ácido nalidíxico e sensibilidade às fluoroquinolonas; a outra *E. coli* apresentou resistência ao ácido nalidíxico e à moxifloxacina, e resistência intermediária à enrofloxacin. Duas *K. pneumoniae* apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e à enrofloxacin (**Tabela 1 e Anexo 1**). Nos isolados resistentes às fluoroquinolonas, é possível que tenham ocorrido mutações nos genes cromossômicos *gyrA* e *parC*, que codificam altos níveis de resistência.⁽⁶³⁾

Com relação aos isolados de CRS, observamos que as duas *Salmonella* são carreadoras de *qnrB* e a presença em carne suína é importante e deve ser alvo de vigilância, considerando que a disseminação destes genes pode consistir em risco para a saúde pública, por selecionar alto nível de resistência às fluoroquinolonas, que são importantes opções terapêuticas para o tratamento de infecções graves por este patógeno.⁽¹⁸⁵⁾ Já as três *K. pneumoniae* carreadoras de *qnrB* isoladas de CRS apresentaram resistência apenas à moxifloxacina e resistência intermediária ao ácido nalidíxico e enrofloxacin.

Assim, pôde-se observar que entre as Enterobacteriaceae isoladas neste estudo, a presença isolada de *qnrB* também não promoveu altos índices de resistência. Neste contexto, foi interessante observar que alguns isolados de CRS resistentes a todas as

fluoroquinolonas testadas não apresentaram *qnrB* ou qualquer dos genes plasmidiais de resistência às quinolonas investigados neste estudo. Nestes isolados é possível tenham ocorrido mutações nos genes cromossômicos *gyrA* e *parC*.⁽⁶³⁾

4.3.2.2. Genes *qnrS* e *qnrA*

Entre as Enterobacteriaceae testadas, o gene *qnrS*, posteriormente sequenciado e identificado como *qnrS1*, foi detectado em uma *K. pneumoniae* isolada de CRF (**Figura 16**), também carreadora de *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{SHV11} e *bla*_{TEM-1}. O gene *qnrS* tem sido descrito em *Salmonella* isoladas da cadeia produtora de alimentos,⁽¹³⁷⁾ mas este é o primeiro relato de *qnrS1* em Enterobacteriaceae isolada de carne no Brasil.

Além deste, no isolado S147 (**Figura 16**), identificado pelo Vitek[®] 2 Compact como *Aeromonas sobria*, foi detectada a coexistência dos genes *qnrA* e *qnrS*. Esta espécie não pertence à família Enterobacteriaceae, mas pode se multiplicar nos meios de cultura utilizados neste estudo. Apesar de inesperado, este resultado merece atenção, pois *Aeromonas sobria* é um patógeno humano oportunista comumente associado a infecções do TGI.⁽⁸²⁾

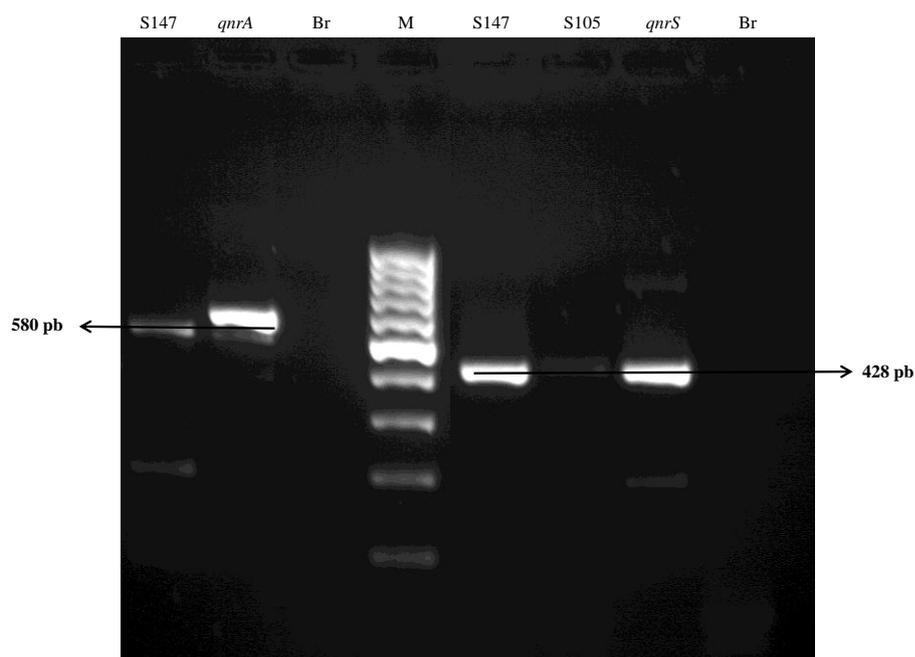


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 2% referente à reação de PCR para detecção do gene *qnr*. [M: marcador de peso molecular de 100 pb; *qnrA*: controle positivo (580 pb); *qnrS*: controle positivo (428 pb); Br: controle negativo.]

4.3.2.3. Genes *oqxAB*

O gene *oqxAB* foi detectado em sete *E. coli* (S94, S143, S178, S183, Lac60, Ec57 e Ec61) e três *K. pneumoniae* (S104, S105 e Lac129) isoladas de CRF e quatro *K. pneumoniae* (Lac3, Lac87, Lac88 e Lac98) e três *E. coli* (Lac99, Lac100 e Lac105) isoladas de CRS, como mostra nas **Figuras 17, 18, 19 e 20**, com tamanho aproximado de 6000 pb, acredita-se que os isolados que amplificaram em aproximadamente 3000 pb também possam conter parte do *oqxAB*, por se tratar de um operon.

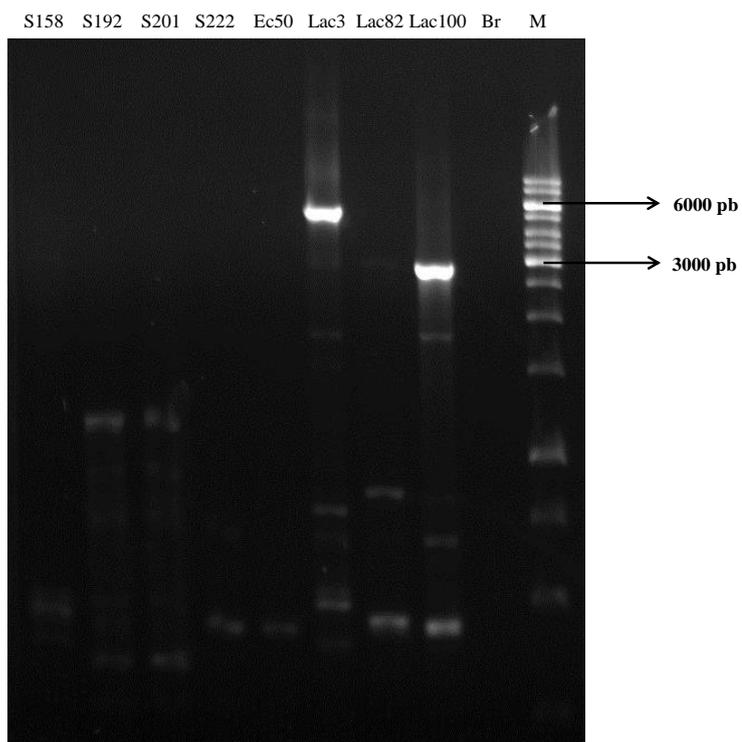


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à PCR para detecção do gene *oqxAB*. [M: marcador de peso molecular de 1 kb; Br: controle negativo.]

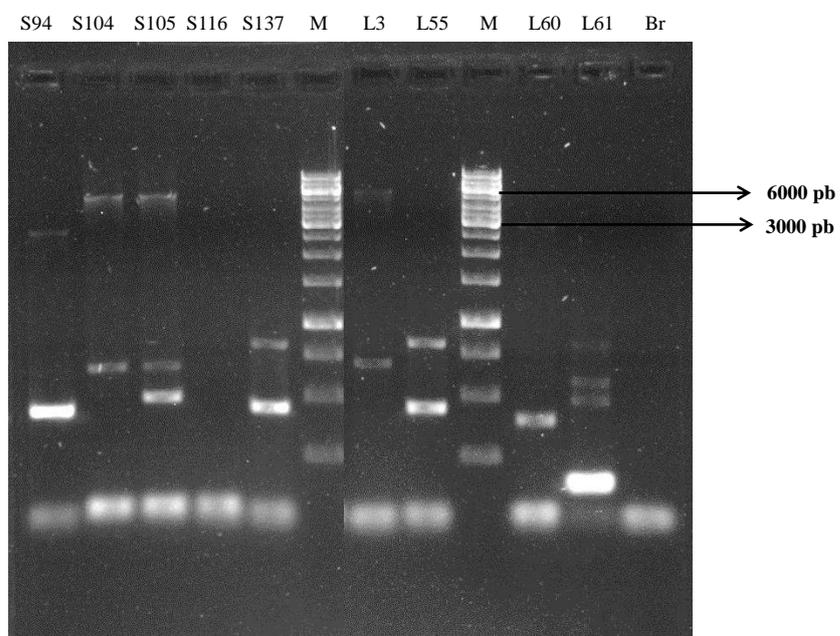


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à PCR para detecção do gene *oqxAB*. [M: marcador de peso molecular de 1 kb; L3: controle positivo; Br: controle negativo.]

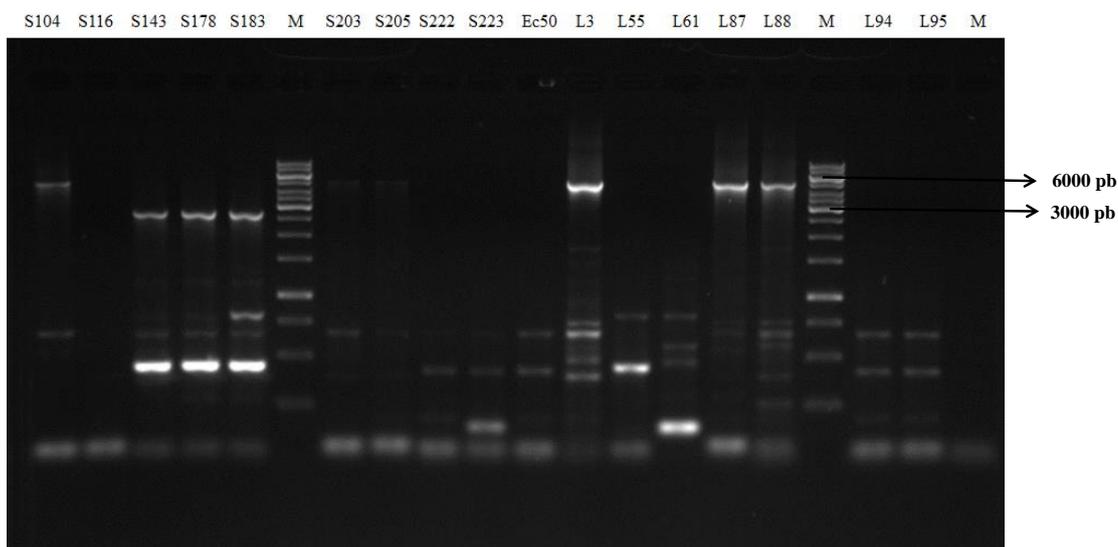


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à PCR para detecção do gene *oqxAB*. [M: marcador de peso molecular de 1 kb; L3: controle positivo; Br: controle negativo.]

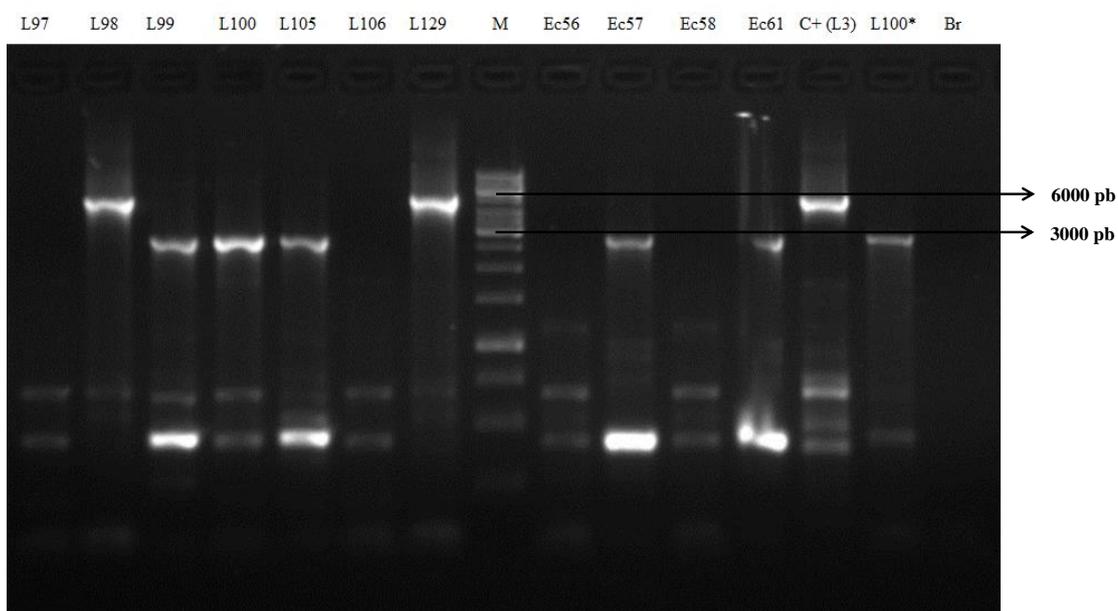


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à PCR para detecção do gene *oqxAB*. [M: marcador de peso molecular de 1 kb; L3: controle positivo; Br: controle negativo.]

A bomba de efluxo OqxAB foi assim denominada por codificar resistência ao olanquinox, um antimicrobiano da família das quinoxalinas. Foi inicialmente descrita em *E. coli* isoladas de esterco de porco.⁽⁶⁸⁾ Anos após, observou-se que conferia resistência a diferentes antimicrobianos.⁽⁶⁹⁾ Tem sido relacionada a baixos níveis de resistência às quinolonas, como evidenciado pela suscetibilidade reduzida ao ácido nalidíxico e a ciprofloxacina em isolados carreadores do operon.⁽⁶⁹⁾ Entretanto, este fenótipo favorece a sobrevivência em baixas concentrações de fluoroquinolonas, essenciais para a subsequente geração de mutações cromossômicas em *gyrA* e *parC* que promovem altos níveis de resistência.⁽¹⁸⁸⁾

Em 2010, Zhao e colaboradores⁽¹⁸⁸⁾ descreveram a ampla disseminação de *oqxAB* em bactérias isoladas de diferentes animais de produção na China, o que relacionaram ao amplo uso do olanquinox como promotor de crescimento. No Brasil, olanquinox foi usado como promotor de crescimento até 2004, sendo adicionada na ração destinada a alimentação de suínos, frangos e bovinos.⁽⁴²⁾ Esse fato pode ter favorecido a seleção e disseminação de bactérias carreadoras deste gene. Apesar disso, em nosso conhecimento, este é o primeiro relato da detecção de *oqxAB* em bactérias isoladas de animais no país.

K. pneumoniae, é descrita como considerada reservatório natural de genes *oqxAB*. Nesta espécie, estes genes são conservados e têm localização cromossômica,⁽⁹²⁾ o que pode justificar o fato de a maioria dos carreadores isolados neste estudo pertencerem a esta espécie. Mas em *E.coli*, *oqxAB* está localizado em plasmídeo, sendo flanqueado por elementos de inserção que facilitam sua mobilização e disseminação entre diferentes cepas.⁽¹⁰⁴⁾ Assim, consideramos o isolamento de *E.coli* carreadora de *oqxAB* de grande importância. Este isolado, que apresentou resistência ao ácido nalidíxico e a todas as fluoroquinolonas testadas, foi investigado quanto a presença de genes da família *qnr* e *qepA*, mas estes não foram detectados.

5. CONCLUSÃO

Dentre os isolados obtidos de carnes de frango, suína e bovina:

- 75 bactérias apresentaram perfil fenotípico sugestivo para produção de ESBL;
- 125 bactérias apresentaram perfil fenotípico de resistência ou resistência intermediária para quinolonas;

Em relação à detecção de genes de resistência:

- O gene *bla_{SHV}* foi detectado em 16% das cepas selecionadas, sendo que em uma foi identificada a variante *bla_{SHV-2}*;
- O gene *bla_{TEM}* foi detectado em 6,6% das cepas selecionadas e todas as cepas foram identificadas como *bla_{TEM-1}*. Assim como na identificação de *bla_{TEM}*, em *bla_{SHV}*, também foram identificadas as variantes *bla_{SHV-1}* e *bla_{SHV-11}*, que apesar de serem genes de espectro restrito encontradas em cepas possivelmente patogênicas e sendo isoladas de alimentos é de extrema importância, devido ao gene poder sofrer mutações que acarretem na expressão de beta-lactamases de espectro estendido;
- O gene *bla_{CTX-M}* foi detectado em 6,6% das cepas selecionadas. Sendo que o sequenciamento identificou todos os *bla_{CTX-M}* detectados como codificadores da enzima CTX-M-2 e todos foram isolados de carne resfriada de frango;
- O gene *qnrA* foi detectado em 0,8% das cepas selecionadas;
- O gene *qnrS* foi detectado em 1,6% das cepas selecionadas e seu sequenciamento identificou como *qnrS1*;
- O gene *oqxAB* foi detectado em 13,6% das cepas selecionadas;
- O gene *qnrB* foi detectado em 19,2% das cepas selecionadas e o sequenciamento identificou duas variantes, *qnrB2* e *qnrB19*, corroborando com dados da literatura devido a alta taxa de detecção de *qnrB* em relação às outras variantes de *qnr* encontrados em Enterobacteriaceae;

Este estudo mostrou que diferentes espécies de Enterobacteriaceae multirresistentes e sendo carreadoras de genes de ESBLs e de resistência às quinolonas estão presentes em carnes, podendo conferir um risco à saúde pública. Indicando que é necessária a vigilância na utilização de antimicrobianos na medicina humana e veterinária, bem como instalação de programas que avaliem a cadeia produtiva destes alimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Aarestrup FM. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Emerging Infectious Disease Journal* 2006; 12 (7):1180-1.
- 2- Almeida IAZC, Peresi JTM, Carvalho IS, Rodrigues ECA, Marques DF, Tavechio AT, Fernandes SA. *Salmonella*: sorotipos identificados na região de São José do Rio Preto/SP, no período de 1990 – 1999. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 2000; 59 (1/2):33-37.
- 3- Almeida RCC, Kuaye AY, Serrano AM, Almeida PF. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. *Revista de Saúde Pública* 1995; 29 (4):250-254.
- 4- Andreatti Filho RL. Alimentos funcionais na produção avícola. *Saúde Aviária e Doenças*, cap.6, p.41-51. São Paulo (SP): Rocca; 2006.
- 5- APUA – Alliance for the Prudent Use of Antibiotics. Practitioner guidelines. 2006; <http://www.tufts.edu/med/apua/Practitioners/healthcare.html>.
- 6- Bager F, Madsen M, Christensen J, Aarestrup FM. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prevent Veterinary Medicine* 1997; 31: 95-112.

- 7- Bertrand S, Weill FX, Cloeckert A, Vrints M, Mairiaux E, Praud K, et al. Clonal emergence of extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44 (8):2897-903.
- 8- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48 (1):1-14.
- 9- Bradford PA, Petersen PJ, Fingerman IM, White DG. Characterization of expanded-spectrum cephalosporin resistance in *E. coli* isolates associated with bovine calf diarrhoeal disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1999; 44:607-610.
- 10- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde: Módulo I – principais síndromes infecciosas. Brasília (DF); 2004.
- 11- Brasil. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Notícias; 2013; <http://www.agricultura.gov.br/politica-agricola/noticias/2013/04/consumo-domestico-aumentara-oferta-de-carne-no-brasil>
- 12- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Balança Comercial – Exportações brasileiras do agronegócio: União Européia 27. Brasília (DF); 2012; <http://www.agricultura.gov.br/internacional/indicadores-e-estatisticas/balanca-comercial>

- 13- Briñas L, Moreno MA, Zarazaga M, Porrero C, Sáenz Y, García M, et al. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 β -lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; 47 (6):2056-58.
- 14- Briongos-Figuero LS, Gómez-Traveso T, Bachiller-Luque P, Domínguez-Gil GM, Gómez-Nieto A, Palacios-Martín T, et al. Epidemiology, risk factors and comorbidity for urinary tract infections caused by extended-spectrum betalactamase (ESBL)-producing enterobacteria. *International Journal of Clinical Practice* 2012; 66 (9):891-896.
- 15- Bush K. New beta-lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 32 (7):1085-89.
- 16- Butolo JE. Uso de aditivos na alimentação de aves: frangos de corte. In: Simpósio sobre as implicações sócio-econômicas do uso de aditivos na produção animal 1999; Piracicaba (SP): Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. p.85-94.
- 17- Butolo JE. Qualidade de ingredientes na alimentação animal. 1ª ed. Campinas (SP): Colégio Brasileiro de Nutrição Animal; 2002.
- 18- Campos CB, Fenner I, Wiese N, Lensing C, Christner M, Rohde H, et al. Prevalence and genotypes of extended spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from human stool and chicken meat in Hamburg, Germany. *International Journal of Medical Microbiology* 2014; 304:678-684.

- 19- Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology* 2006; 9:466-75.
- 20- Capozzi V, Spano G. Horizontal gene transfer in the gut: Is it a risk? *Food Research International* 2009; 42:1501-2.
- 21- Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; 14:117-23.
- 22- Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53 (6):2227-2238.
- 23- Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 60:394-397.
- 24- Cavaco LM, Abatih E, Aarestrup FM, Guardabassi L. Selection and Persistence of CTX-M-Producing *Escherichia coli* in the Intestinal Flora of Pigs Treated with Amoxicillin, Ceftiofur or Cefquinome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52 (10):3612–3616.
- 25- Cergole-Novella MC, Guth BE, Castanheira M, Carmo MS, Pignatari AC. First description of bla(CTX-M-14)- and bla(CTX-M-15)-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *Microbial Drug Resistance* 2010; 16(3):177-84.

- 26- Cerquetti M, García-Fernández A, Giufrè M, Fortini D, Accogli M, Graziani C, et al. First report of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* in an *Escherichia coli* strain of animal origin in Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53 (7):3112-4.
- 27- Chen YH, Ko WC, Hsueh PR. The role of fluoroquinolones in the management of urinary tract infections in areas with high rates of fluoroquinolone-resistant uropathogens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2012; 31 (8):1699-704.
- 28- Clímaco EC, Minarini LAR, Darini ALC. CTX-M-producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2010; 68:186-9.
- 29- Cloeckaert A, Praud K, Doublet B, Bertini A, Carattoli A, Butaye P, et al. Dissemination of an extended-spectrum- β -lactamase *bla*_{TEM-52} gene-carrying Inc11 plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; 51 (5):1872-5.
- 30- Cloeckaert A, Praud K, Lefevre M; Doublet B, Pardos M, Granier SA, et al. Inc11 plasmid carrying extended-spectrum- β -lactamase gene *bla*_{CTX-M-1} in *Salmonella enterica* isolates from poultry and humans in France, 2003 to 2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; 54 (10):4484-4486.

- 31- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. third edition. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- 32- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-first Informational Supplement M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011, 31 (1).
- 33- Coque TM, Baquero F, Cantón R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance* 2008; 13 (47).
- 34- Corneli J. Avaliação de promotores de crescimento alternativos em substituição aos convencionais sobre o desempenho, características de carcaça e morfometria intestinal em frangos de corte [dissertação] – Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2004.
- 35- Dan SD, Tabaran A, Mihaiu L, Mihaiu M. Antibiotic susceptibility and prevalence of foodborne pathogens in poultry meat in Romania. *Journal of Infection in Developing Countries* 2015; 9 (1):35-41.
- 36- D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology* 2013; 303 (6-7):305-17.

- 37- Daniels NA, Mackinnon L, Rowe SM, Bean NH, Griffin PM, Mead PS. Foodborne disease outbreaks in United States schools. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2002; 21(7):623-628.
- 38- Denton M. Enterobacteriaceae. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007; 29 (3):S9-S22.
- 39- Do Carmo Filho Jr, Silva RM, Castanheira M, Tognim MC, Gales AC, Sader HS. Prevalence and genetic characterization of *bla*_{CTX-M} among *Klebsiella pneumoniae* isolates collected in an intensive care unit in Brazil. *Journal of Chemotherapy* 2008; 20 (5):600-603.
- 40- Donado-Godoy P, Gardner I, Byrne BA, Leon M, Perez-Gutierrez E, Ovalle MV, et al. Prevalence, risk factors, and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* from commercial broiler farms in two important poultry-producing regions of Colombia. *Journal of Food Protection* 2012; 75 (5):874-883.
- 41- Drasar BS, Hill MJ. Human intestinal flora. London. Academic Press Limited 1974:36-43.
- 42- Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, et al. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases* 2010; 16 (1):48-54.
- 43- Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing

Escherichia coli and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; 47 (12):3724-3732.

- 44- Eisel WG, Linton RH, Muriana PM. A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a red meat processing plant. *Food Microbiology* 1997; 14:273-82.
- 45- Ensor V, Warren R, O'Neill P, Butler V, Taylor J, Nye K, et al. Isolation of quinolone-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from raw chicken meat sold in retail outlets in the West Midlands, UK. *Clinical Microbiology and Infection* 2007; 13:274-5.
- 46- EUA (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA). FDA – Food and Drug Administration. United States food safety system: precaution in U.S. food safety decisionmaking: annex II to the United States' National Food Safety System Paper. United States: United States Department of Agriculture 2006; <http://web.archive.org/web/20000818175224/http://www.foodsafety.gov/~fsg/fssyst4.html>.
- 47- EUA (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA). Food and Drug Administration. *Salmonella*. In: ANDREWS, W. H; HAMMACK, T. S. *Bacteriological Analytical Manual Online*. Silver Spring. 2007 (Chapter 5); <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>
- 48- EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Basel, Suíça). Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST

2011; 2. [Acesso em: 10 de abril de 2015] Disponível em:
http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

- 49- Evangelista, J. Tecnologia de alimentos. 2ª ed. São Paulo (SP): Editora Atheneu; 2001.
- 50- Faair Scientific Advisory Panel. Policy Recommendations. In: Barza M, Gorbach SL (Eds.). The Need to Improve Antimicrobial Use in Agriculture: Ecological and Human Health Consequences. *Clinical Infectious Diseases* 2002; 34 (3):76-7.
- 51- Fàbrega A, Sanchez-Cespedes J, Soto S, Vila J. Quinolone resistance in the food chain. *International Journal Antimicrobial Agents* 2008; 31:307-15.
- 52- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Animal Food Production: Code of Practice to Minimize and Contain Antimicrobial Resistance. 2009. Rome: Animal Food Production. 2nd ed. (Pt 3):205-46.
- 53- Fernández AG, Cloeckaert A, Bertini A, Praud K, Doublet B, Weill FX, et al. Comparative analysis of IncHI2 plasmids carrying *bla*CTX-M-2 or *bla*CTX-M-9 from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains isolated from poultry and humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; 51 (11):4177-4180.
- 54- Ferrari R, Galiana A, Cremades R, Rodríguez JC, Magnani M, Tognim MCB, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* strains isolated in Brazil. *Journal of Infection in Developing Countries* 2011; 5 (6):496-498.

- 55- Fonzé E, Charlier P, To'th Y, Vermeire M, Raquet X, Dubus A, et al. TEM1 beta-lactamase structure solved by molecular replacement and refined structure of the S235A mutant. *Acta Crystallographica D Biological Crystallography* 1995; 51 (Pt 5):682-94.
- 56- Franco RM, Mantilla SPS. *Escherichia coli* em corte de carne bovina (acém): avaliação de metodologia e sensibilidade antimicrobiana ao sorovares predominantes. In: XIV Seminário de Iniciação Científica e Prêmio UFF Vasconcellos Torres de Ciência e Tecnologia 2004. CD.
- 57- Fricke WF, McDermott PF, Mammel MK, Zhao S, Johnson TJ, Rasko DA, et al. Antimicrobial resistance-conferring plasmids with similarity to virulence plasmids from avian pathogenic *Escherichia coli* strains in *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolates from poultry. *Applied Environmental Microbiology* 2009; 75 (18):5963-5971.
- 58- FSIS - Food Safety and Inspection Service/Estados Unidos. *Salmonella* Enteritidis risk assessment. Shell Eggs and Egg Products. Washington (DC): U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service; 1998; <http://www.fsis.usda.gov/ophs/risk/>.
- 59- Garcia DO, Doi Y, Szabo D, Adams-Haduch JM, Vaz TMI, Leite D, et al. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52 (5):1790-3.

- 60- García CS, de la Gándara MP, García FJ. Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteria other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2010; 1:12-18.
- 61- Gill CO, Badoni M, Jones T. Hygienic effects of trimming and washing operations in a beef-carcass-dressing process. *Journal of Food Protection* 1996; 59 (6):666-9.
- 62- Gomes DM. Resíduos de antibióticos promotores de crescimento em produtos de origem animal. [Monografia - especialização]. Brasília (DF): Universidade de Brasília, Centro de Excelência em Turismo, Qualidade de Alimentos; 2004.
- 63- Guan X, Xue X, Liu Y, Wang J, Wang Y, Wang J, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance--current knowledge and future perspectives. *Journal of International Medical Research* 2013; 41 (1):20-30.
- 64- Gupta SK, Nalluswami K, Snider C, Perch M, Balasegaram M, Burmeister D, et al. Outbreak of *Salmonella* Braenderup infections associated with Roma tomatoes, northeastern United States, 2004: a useful method for subtyping exposures in field investigations. *Epidemiology and Infection* 2007; 135 (7):1165-73.
- 65- Gutkind GO, Di Conza J, Power P, Radice M. β - lactamase - mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. *Currente Pharmaceutical Dedign* 2013; 19 (2):164-208.

- 66- Gyles CL. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Animal Health Research Reviews* 2008; 9 (2):149-158.
- 67- Hæggman S, Lofdahl S, Paauw A, Verhoef J, Brisse S. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48 (7):2400-8.
- 68- Hansen LH, Johannesen E, Burmolle M, Sorensen AH, Sorensen SJ. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48 (9):3332-7.
- 69- Hansen LH, Jensen LB, Sorensen HI, Sorensen SJ. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 60 (1):145-7.
- 70- Harada K, Asai T. Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. *Journal of Biomedicine Biotechnology*, 2010; <http://dx.doi.org/10.1155/2010/180682>.
- 71- Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I, Aarestrup FM. β -lactamases among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 56:115-21.

- 72- Hawkey PM. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *British Journal of Pharmacology* 2008; 153:406-13.
- 73- Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1999; 44:309-18.
- 74- Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A, Spanish Group For Nosocomial Infections (GEIH). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005; 49 (5):2122-5.
- 75- Howard SJ, Hopwood S, Davies SC. Antimicrobial resistance: a global challenge. *Science Translational Medicine* 2014; 6 (236).
- 76- ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microbial Ecology of Food Commodities*. 2nd ed. New York: Kluwer Academic, Plenum Publishers (*Microorganisms in foods*, 6); 2005.
- 77- Jacoby GA, Carreras I. Activities of beta-lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1990; 34 (5):858-62.
- 78- Jacoby GA, Bush K. β -lactamase nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(12):6220.

- 79- Jacoby GA, Muñoz-Price LS. The new β -lactamases. *New England Journal of Medicine* 2005; 352:380-391.
- 80- Jacoby GA, Griffin CM, Hooper DC. *Citrobacter* spp. As a Source of *qnrB* Alleles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; 55 (11):4979-84.
- 81- Jakobsen L, Spangholm DJ, Pedersen K, Jensen LB, Emborg HD, Agersø Y, et al. Broiler chickens, broiler chicken meat, pig and pork as source of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. *International Journal of Food Microbiology* 2010; 142 (Issues 1-2):264-72.
- 82- Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2010; 23 (1):35-73.
- 83- Jay JM. (Ed.). *Modern Food Microbiology*. 6th ed. United States: Aspen Publishers; 2000. p. 1-53, 170 e 363-420.
- 84- Johnson JR, Sannes MR, Croy C, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, et al. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. *Emerging Infectious Diseases* 2007; 13 (6):838-46.
- 85- Jouini A, Vinué L, Slama KB, Sáenz Y, Klibi N, Hammami S, et al. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum β -lactamases and associated resistance genes

- in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 60:1137-1141.
- 86- Kaiser P, Hardt WD. *Salmonella* Typhimurium diarrhea: switching the mucosal epithelium from homeostasis to defense. *Current Opinion in Immunology* 2011; 23:456-463.
- 87- Kanamori H, Yano H, Hirakata Y, Endo S, Arai K, Ogawa M, et al. High prevalence of extended-spectrum β -lactamases and *qnr* determinants in *Citrobacter* species from Japan: dissemination of CTX-M-2. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011; 66:2255-2262.
- 88- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2:123-40.
- 89- Karczmarczyk M, Martins M, McCusker M, Mattar S, Amaral L, Leonard N, et al. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* food and animal isolates from Colombia: identification of a *qnrB19*-mediated quinolone resistance marker in two novel serovars. *Federation of European Microbiological Societies - Microbiological Letters* 2010; 313:10-19.
- 90- Kich JD, Coldebella A, Morés N, Nogueira MG, Cardoso M, Fratamico PM, et al. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 2011; 151:307-313.

- 91- Kim SH, Wei CI, An H. Molecular characterization of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates from retail meat products. *Journal of Food Protection* 2005; 68 (7):1408-1413.
- 92- Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53 (2):639-645.
- 93- Knothe H, Shah P, Kromery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofuran, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11 (6):315-317.
- 94- Kola A, Kohler C, Pfeifer Y, Schwab F, Kuhn K, Schulz K, et al. High prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012; 67 (11):2631-4.
- 95- Koningstein M, Simonsen J, Helms M, Mølbak K. The interaction between prior antimicrobial drug exposure and resistance in human *Salmonella* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; 65:1819-25.
- 96- Kruse H, Sorum H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied and Environmental Microbiology* 1994; 60 (11):4015-21.

- 97- Layton AN, Galyov EE. *Salmonella*-induced enteritis: molecular pathogenesis and therapeutic implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2007; 9 (18):1-17.
- 98- Leal RMP, Figueira RF, Tornisielo VL, Regitano JB. Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo State, Brazil. *Science of the Total Environment* 2012; 432:344-349.
- 99- Lee YH, Cho B, Bae IK, Cgang CL, Jeong SH. *Klebsiella pneumoniae* strains carrying the chromosomal SHV-11 beta-lactamase gene produce the plasmid-mediated SHV-12 extended-spectrum beta-lactamase more frequently than those carrying the chromosomal SHV-1 beta-lactamase gene. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; 57 (6):1259-1261.
- 100- Leite AMO, Franco RM. Coliformes totais e *Escherichia coli* em coxas de frango comercializados no Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária* 2006; 13 (2):80-83.
- 101- Leverstein-Van Hall MA, Dierikx CM, Stuart JC, Voets GM, Van Den Munckhof MP, Van Essen-Zandbergen A, et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clinical Microbiology and Infection* 2011; 17 (6):873-880.
- 102- Levinson W, Jawetz E. *Microbiologia médica e imunologia*. 7ª ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2005.

- 103- Lima-Filho JV, Martins LV, Nascimento DC, Ventura RF, Batista JE, Silva AF, et al. Zoonotic potential of multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* obtained from healthy poultry carcasses in Salvador, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2013; 17 (1):54-61.
- 104- Liu BT, Yang QI, Li L, Sun J, Liao X, Fang L, et al. Dissemination and Characterization of Plasmids Carrying *oqxAB-blaCTX-M* Genes in *Escherichia coli* Isolates from Food-Producing Animals. *PLoS ONE* 2013; 8 (9).
- 105- Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 1995; 8;557-84.
- 106- Livermore DM, Woodford N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology* 2006; 14:413-20.
- 107- Lutz EA, McCarty MJ, Mollenkopf DF, Funk JA, Gebreyes WA, Wittum TE. Ceftiofur Use in Finishing Swine Barns and the Recovery of Fecal *Escherichia coli* or *Salmonella* spp. Resistant to Ceftriaxone. *Foodborne Pathogens and Disease* 2011; 8 (11):1229-34.
- 108- Ma J, Zeng Z, Chen Z, Xu X, Wang X, Deng Y, et al. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53 (2):519-24.

- 109- Machado E, Coque TM, Cantón R, Sousa JC, Peixe L. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 62:296-302.
- 110- Madec JY, Lazizzera C, Châtre P, Meunier D, Martin S, Lepage G, et al. Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-spectrum cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae strains from cattle in France. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46 (4):1566-7.
- 111- Manges AR, Smith SP, Lau BJ, Nuval CJ, Eisenberg JNS, Dietrich PS, et al. Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: a case-control study. *Foodborne Pathogens and Disease* 2007; 4 (4):419-31.
- 112- Manges AR, Johnson JR. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clinical Infectious Disease* 2012; 55 (5):712-719.
- 113- Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews* 2011; 24 (4):718-733.
- 114- Martins RP, Da Silva MC, Dutra V, Nakazato L, Leite DS. Prevalence of enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in pigs slaughtered in Mato Grosso, Brazil. *Journal of Infection in Developing Countries* 2011; 5 (2):123-127.

- 115- Matsubara, E.N. Condição higiênico-sanitária de meias-carcaças de suínos após o abate e depois do resfriamento e análise da utilização de lista de verificação para avaliar boas práticas no abate de suínos [dissertação]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2005.
- 116- Mendes C, Kiffer C, Segura A, Ribeiro J, Turner P. *Klebsiella pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2004; 8 (1):109-111.
- 117- Menin A, Souza CRD, Vaz CKE. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Ciência Rural 2008; 38 (6):1687-1693.
- 118- Minarini LA, Camargo IL, Pitondo-Silva A, Darini AL. Multilocus sequence typing of uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* isolated in a Brazilian community. Current Microbiology 2007; 55 (6):524-9.
- 119- Minarini LA, Clímaco EC, Guimarães DB, Ferreira JC, Palazzo IC, Martinez R, et al. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella* spp. at a university hospital in Brazil. Current Microbiology 2008; 56 (6):587-591.
- 120- Morris D, O'Hare C, Glennon M, Maher M, Corbett-Feeney G, Cormican M. Extend-spectrum β -lactamases in Ireland, including a novel enzyme, TEM-102. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2003; 47:2572-2578.

- 121- Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; 14:42-52.
- 122- Nayak R, Stewart T, Wang RF, Lin J, Cerniglia CE, Kenney PB. Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. *International Journal of Food Microbiology* 2004; 91:51-62.
- 123- NCBI (National Center for Biotechnology Information). Basic Local Alignment Search Tool. Bethesda; 2012. [Acesso em 10 de abril de 2015] Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- 124- Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, et al. Food-borne diseases – the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology* 2010; 139 (1):3-15.
- 125- Nüesch-inderbinen MT, Kayser FH, Hächler H. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in Enterobacteriaceae in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 41 (5):943-949.
- 126- OIE. World Organization for Animal Health. Terrestrial Animal Health Code – Section 6: Veterinary Public Health. 2012. [Acesso em 10 de abril de 2015] Disponível em: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-code/accessonline/>

- 127- OIE. World Organization for Animal Health. List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. 2014. [Acesso em: 10 de abril de 2015] Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/OIE_list_antimicrobials.pdf
- 128- Overdeest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, et al. Extended-spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 2011; 17 (7):1216-22.
- 129- Pan YJ, Fang HC, Yang HC, Lin TL, Hsieh PF, Tsai FC, et al. Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46 (7):2231-2240.
- 130- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 18 (4):657-86.
- 131- Peirano G, Agersø Y, Aarestrup FM, Reis EMF, Rodrigues DP. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; 58:305-9.
- 132- Peresi JTM. Perfil epidemiológico dos surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, elucidados laboratorialmente, ocorridos na região Noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003 e susceptibilidade das cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* aos agentes antimicrobianos [Dissertação]. São José do Rio Preto (SP): Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2004.

- 133- Persoons D, Haesebrouck F, Smet A, Herman L, Heyndrickx M, Martel A, et al. Risk factors for ceftiofur resistance in *Escherichia coli* from Belgian broilers. *Epidemiology and Infection* 2011; 139 (5):765-71.
- 134- Pessanha RP, Gontijo Filho PP. Antimicrobial use as growth promoters and resistance for isolates of *Escherichia coli* and of Enterobacteriaceae lactose negative of the fecal microflora of broiler chickens. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2001; 53 (1).
- 135- Pitout JDD, Revathi G, Chow BL, Kabera B, Kariuki S, Nordmann P, et al. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; 14:755-9.
- 136- Pitout JDD. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. *Expert Review of Anti Infective Therapy* 2008; 6:657-69.
- 137- Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infection, Genetics and Evolution* 2012; 12 (5):883-893.
- 138- Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, Rúbio FG, Nogueira ML, de Almeida MT, et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring blaCTX-M-2, blaGES-1 and blaGES-5, blaIMP-1 and SPM-1 causing infectious in Brazilian tertiary-care hospital. *BioMed Central Infectious Diseases* 2012; 12:176-183.

- 139- Popoff MY, Le Minor LE. The genus *Salmonella*. In: Brenner DJ, Krieg, NR, Staley JT, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. New York (NY): Springer, v.2; 2005. p.764-99.
- 140- Prescott JF. Antimicrobial use in food and companion animals. *Animal Health Research Reviews* 2008; 9 (2):127-33.
- 141- Price LB, Graham JP, Lackey LG, Roess A, Vailes R, Silbergeld E. Elevated risk of carrying gentamicin-resistant *Escherichia coli* among U.S. poultry workers. *Environmental Health Perspectives* 2007; 115 (12):1738-42.
- 142- Pruijboom-Bress IM, Morgan TW, Ackermann MR, Nystrom ED, Samuel, JEA, Cornick NA, et al. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 shiga toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97 (19):10325-9.
- 143- Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46 (2):602-604.
- 144- Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology* 2014; 22 (8):438–445.
- 145- Rhoades JR, Duffy G, Koutsoumanis K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. *Food Microbiology* 2009; 26 (4):357-76.

- 146- Riaño I, Moreno MA, Teshager T, Sáenz Y, Domínguez L, Torres C. Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; 58:844-7.
- 147- Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50 (8):2872-4.
- 148- Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: na update. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2011; 17:149-182.
- 149- Ruiz E, Sáenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, Martínez-Martínez L, Arlet G, et al. *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012; 67:886-897.
- 150- RuralBR. Consultoria prevê alta de 3% no consumo per capita de carne bovina no Brasil. Grupo RBS, notícia *on line* de 28 de junho de 2012 [Acesso em: 10 de abril de 2015]. Disponível em: <http://www.canalrural.com.br/noticias/pecuaria/consultoria-reve-alta-consumo-per-capita-carne-bovina-brasil-37419>
- 151- Saladin M, Cao VTB, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, et al. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from

Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Letters 2002; 209:161-8.

- 152- Santos LR, Nascimento VP, Flores ML, Rosek H, D'Andrea A, Albuquerque MC, et al. *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no estado do Rio Grande do Sul. Higiene Alimentar 2002; 16 (102/103):93-99.
- 153- Scallan E, Griffin PM, Angulo FJ, Tauxe RV, Hoekstra RM. Foodborne illness acquired in the United States – unspecified agents. Emerging Infectious Diseases 2011; 17 (1):16-22.
- 154- Schmidt, J.W.; Griffin, De.; Kuehn, L.A.; Brichta-Harhay, D.M. Influence of therapeutic ceftiofur treatments of feedlot cattle on fecal and hide prevalences of commensal *Escherichia coli* resistant to expanded-spectrum cephalosporins, and molecular characterization of resistant isolates. Applied and Environmental Microbiology 2013; 79 (7):2273-83.
- 155- Schneider T, Sahl HG. An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. International Journal of Medical Microbiology 2010; 300 (2-3):161-9.
- 156- Shaumburg F, Alabi AS, Frielinghaus L, Grobusch MP, Kock R, Becker K, et al. The risk to import ESBL-producing *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus aureus* through chicken meat trade in Gabon. BioMed Central Microbiology 2014; 14:286-292.

- 157- Shelobolina ES, Sullivan SA, O'Neill KR, Kevin KP, Lovley DR. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranean* sp. nov. Applied and Environmental Microbiology 2004; 70 (5):2959-65.
- 158- Shiraki Y, Shibata N, Doi Y, Arakawa Y. *Escherichia coli* producing CTX-M-2 β -lactamase in cattle, Japan. Emerging Infectious Diseases 2004; 10 (1):69-75.
- 159- Silva JMB, Hollenbach CB. Fluoroquinolonas X resistência bacteriana na medicina veterinária. Arquivos do Instituto Biológico; 2010; 77 (2):363-369.
- 160- Singer RS, Cox Jr. LA, Dickson JS, Hurd HS, Phillips I, Miller GY. Modeling the relationship between food animal health and human foodborne illness. Preventive Veterinary Medicine 2007; 79:186-203.
- 161- Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1987; 20:323-34.
- 162- Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Catry B, et al. Diversity of extended-spectrum β -lactamases and class C β -lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates in Belgian broiler farms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2008; 52 (4):1238-43.

- 163- Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, et al. Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Reviews* 2009;1-22.
- 164- Snoeyenbos GH, Williams JE. Salmonellosis. In: Calnek BW. *Diseases of Poultry*. 9th ed. Iowa: Iowa State University Press, Ames; 1991. p.72-3.
- 165- Sostarich AM, Zolldann D, Haefner H, Luetticken R, Schulze-Roebecke R, Lemmen SW. Impact of multiresistance of Gram-negative bacteria in bloodstream infection on mortality rates and length of stay. *Infection* 2008; 36 (1):31-35.
- 166- Soulsby L. Antimicrobials and animal health: a fascinating nexus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 60 (1):77-8.
- 167- Souza MJ. Desenvolvimento de metodologia para análise de ceftiofur sódico e estudo da estabilidade [Tese]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
- 168- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews* 2009; 22 (4):664-89.
- 169- Stuart JC, Van Den Munckhof T, Voets G, Scharringa J, Fluit A, Leverstein-Van Hall M. Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. *International Journal of Food Microbiology* 2012; 154 (3):212-214.

- 170- Thi PLN, Yassibanda S, Aidara A, Le Bouguéne C, Germani Y. Enteropathogenic *Klebsiella pneumoniae* HIV-infected adults, Africa. *Emerging Infectious Diseases*; 2003; 9 (1):135-137.
- 171- Thiébaud AC, Arlet G, Andremont A, Papy E, Sollet JP, Bernède-Bauduin C, et al. Variability of intestinal colonization with thirdgeneration cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae and antibiotic use in intensive care units. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012; 67 (6):1525-36.
- 172- Tian GB, Wang HN, Zou LK, Tang JN, Zhao YW, Ye MY, et al. Detection of CTX-M-15, CTX-M-22, and SHV-2 extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from pig farms in China. *Foodborne Pathogens and Disease* 2009; 6 (3):297-304.
- 173- Tian SF, Chen BY, Chu YZ, Wang S. Prevalence of rectal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* among elderly people in community settings in China. *Canadian Journal of Microbiology* 2008; 54:781-5.
- 174- Tolentino FM. Detecção e identificação dos genes de beta-lactamases *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} em *Klebsiella pneumoniae* isoladas em um Hospital Terciário do Estado de São Paulo [dissertação]. São José do Rio Preto (SP): Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2009.
- 175- Tollentino FM, Polotto M, Nogueira ML, Lincopan N, Neves P, Mamizuka EM, et al. High prevalence of *bla*_{CTX-M} extended spectrum beta-lactamase genes in

- Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of *blaSHV*-12, *blaSHV*-31, *blaSHV*-38, and *blaCTX*-M-15 in Brazil. *Microbial Drug Resistance* 2011; 17 (1):7-16.
- 176- Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, Farley MM, Shallow S, Marcus R, et al. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 38 (3):127-34.
- 177- Volkova VV, Lanzas C, Lu Z, Gröhn YT. Mathematical Model of Plasmid-Mediated Resistance to Ceftiofur in Commensal Enteric *Escherichia coli* of Cattle. *PLoS ONE* 2012; 7 (5).
- 178- Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53:1892-7.
- 179- Warren RE, Ensor VM, O'Neill P, Butler V, Taylor J, Nye K, et al. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 61:504-508.
- 180- Weill FX, Lailier R, Praud K, K erouanton A, Fabre L, Brisabois A, et al. Emergence of extended-spectrum- β -lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42 (12):5767-73.

- 181- Whichard JM, Medalla F, Hoekstra RM, McDermott PF, Joyce K, Chiller T, et al. Evaluation of antimicrobial resistance phenotypes for predicting multidrug-resistant *Salmonella* recovered from retail meats and humans in the United States. *Journal of Food Protection* 2010; 73 (3):445-51.
- 182- WHO. World Health Organization. Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe. 2011. [Acesso em 25 de agosto de 2015]. Disponível em: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/136454/e94889.pdf
- 183- WHO. World Health Organization. The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action. Geneva. 2012. [Acesso em 10 de abril de 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/patientsafety/implementation/amr/publication/en/index.html>
- 184- Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clinical Microbiology Reviews* 2013; 26(4):744-58.
- 185- Wu J, Ko W, Chiou C, Chen H, Wang L, Yan I. Emergence of Qnr determinants in human *Salmonella* isolates in Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 62:1269–1272.
- 186- Xia LN, Li L, Wu CM, Liu YQ, Tao XQ, Dai L, Qi YH, Lu LM, Shen JZ. A survey of plasmidmediated fluoroquinolone resistance genes from *Escherichia coli* isolates and their dissemination in Shandong, China. *Foodborne Pathogens and Disease* 2010; 7(2):207-215.

- 187- Zarfel G, Galler H, Luxner J, Petternel C, Reinthaler FF, Haar D, et al. Multiresistant bacteria isolated from chicken meat in Austria. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2014; 11:12582-12593.
- 188- Zhao J, Chen Z, Chen S, Deng Y, Liu Y, Tian W, et al. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; 54 (10):4219-24.

ANEXO 1. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos de todas as bactérias isoladas no estudo e a diversidade genética.

Isolado	Data do Isolamento	Local	Fonte de Isolamento	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																			Diversidade genética			
					AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	EIP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO	OFX		MXF ^a	NA	CIP
					R ≤ 13	R ≤ 11	R ≤ 17	R ≤ 14	R ≤ 14	R ≤ 22	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 14	R ≤ 17	R ≤ 17	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 12	R ≤ 12	R ≤ 14	R ≤ 13	R ≤ 15	R ≤ 12		R ≤ 16	R ≤ 13	R ≤ 15
S1	16/11/2010	A	CRS	<i>Salmonella</i> spp.	24	24	24	22	26	30	NT	28	24	26	30	26	26	18	20	17	24	NT	25	23	24	NT	NR
S2	16/11/2010	A	CRS	<i>Salmonella</i> spp.	8	8	26	6	28	30	NT	26	24	24	34	24	28	22	24	22	30	NT	28	25	24	NT	NR
S3	16/11/2010	A	CRS	<i>Salmonella</i> spp.	20	19	24	12	26	28	NT	29	18	24	30	24	26	18	20	16	24	NT	22	23	20	NT	NR
S4	16/11/2010	A	CRS	<i>Salmonella</i> spp.	24	24	22	18	24	28	NT	28	19	24	30	26	26	18	20	17	24	NT	24	22	26	NT	NR
S5	16/11/2010	A	CRS	<i>Salmonella</i> Rinsen	26	25	22	24	26	30	NT	28	22	26	30	25	24	18	20	18	26	NT	24	24	24	NT	NR
S6	16/11/2010	A	CRS	<i>Salmonella</i> spp.	24	24	24	22	26	30	NT	30	24	24	30	26	30	18	20	18	28	NT	26	24	23	NT	NR
S7	16/11/2010	A	CRS	<i>Salmonella</i> spp.	6	10	23	6	25	30	NT	30	14	26	30	20	18	20	22	18	30	NT	24	24	28	NT	NR
S8	14/03/2011	A	CRF	<i>Proteus mirabilis</i>	22	17	32	18	26	27	30	28	21	27	37	18	16	19	22	19	19	11	14	9	6	NT	Negativo qnr
S9	14/03/2011	A	CRF	<i>Morganella morganii</i>	6	12	23	6	24	27	30	24	14	27	34	16	16	22	24	19	27	26	26	25	22	NT	NR
S10	14/03/2011	A	CRF	<i>Proteus mirabilis</i>	25	18	24	16	24	30	30	29	24	27	34	18	20	20	24	17	16	7	16	10	6	NT	Negativo qnr
S11	14/03/2011	A	CRF	<i>Proteus mirabilis</i>	13	13	25	6	11	11	18	12	21	24	26	16	20	15	18	18	19	12	14	10	6	NT	bla _{CTX-M-2} / Negativo qnr
S12	14/03/2011	A	CRF	<i>Proteus mirabilis</i>	22	22	24	24	24	31	28	36	22	20	34	22	18	18	22	6	24	12	19	16	6	NT	Negativo qnr
S13	14/03/2011	A	CRF	<i>Providencia stuartii</i>	10	12	20	8	24	30	25	22	22	25	36	20	18	16	19	20	26	26	25	25	24	NT	NR
S14	14/03/2011	A	CRF	NR	6	14	22	6	30	24	24	26	24	18	26	30	26	18	8	18	30	NT	28	26	26	NT	NR
S15	14/03/2011	A	CRF	NR	26	23	26	24	30	30	30	34	24	26	32	28	24	18	19	18	34	NT	32	30	23	NT	NR
S16	04/04/2011	A	CRB	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	18	22	6	28	24	23	25	6	20	26	30	24	16	18	14	30	NT	29	24	20	NT	NR
S17	04/04/2011	A	CRB	NR	6	12	22	6	28	23	24	28	6	20	28	24	26	18	20	18	30	NT	30	28	24	NT	NR
S18	04/04/2011	A	CRB	NR	29	23	24	20	28	28	24	29	12	23	26	24	28	20	23	18	30	NT	29	26	26	NT	NR
S19	04/04/2011	A	CRB	NR	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NR
S20	04/04/2011	A	CRB	NR	8	18	24	12	28	28	26	30	6	24	28	28	28	18	22	18	30	NT	28	24	24	NT	NR
S21	04/04/2011	A	CRB	NR	16	23	20	15	29	27	24	28	6	22	28	27	24	18	18	30	NT	26	26	22	NT	NR	
S22	04/04/2011	A	CRB	NR	8	9	24	6	28	24	23	28	6	22	24	14	26	18	18	28	28	26	28	24	NT	NR	
S23	04/04/2011	A	CRB	<i>Citrobacter freundii</i>	8	6	17	6	26	9	10	13	6	8	12	12	26	18	20	20	30	NT	28	28	26	NT	NR
S24	04/04/2011	A	CRB	NR	6	8	18	6	26	14	12	14	6	6	18	18	24	18	18	34	NT	30	30	24	NT	NR	
S25	04/04/2011	A	CRB	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	10	7	17	6	26	12	12	13	6	8	13	12	24	18	22	18	30	NT	27	28	24	NT	NR
S26	04/04/2011	A	CRB	NR	6	17	26	6	32	24	26	28	20	18	30	24	24	22	24	22	34	NT	32	32	26	NT	NR
S27	25/04/2011	B	CRB	NR	28	24	30	18	34	34	30	25	22	30	35	26	28	22	22	23	NT	30	23	18	NT	Negativo qnr	
S28	25/04/2011	B	CRB	NR	30	28	34	24	38	40	36	42	24	24	44	30	24	20	26	24	40	NT	40	38	24	NT	NR
S29	25/04/2011	B	CRB	NR	28	25	30	24	34	36	36	44	18	30	38	26	22	24	28	18	40	NT	38	36	6	NT	Negativo qnr
S30	25/04/2011	B	CRF	NR	18	24	28	24	30	32	36	42	24	28	34	24	22	24	26	20	44	NT	NT	36	23	NT	NR
S31	25/04/2011	B	CRF	NR	36	24	34	30	38	38	36	44	24	30	36	28	24	28	23	46	NT	42	38	22	NT	NR	
S32	25/04/2011	B	CRF	NR	30	26	36	24	40	48	36	42	24	36	36	32	24	20	22	22	34	NT	32	30	18	NT	Negativo qnr
S33	25/04/2011	B	CRB	NR	24	18	30	18	34	36	30	36	24	30	36	30	24	24	26	24	36	NT	30	30	24	NT	NR
S34	25/04/2011	B	CRB	NR	28	26	30	20	30	34	30	36	24	32	32	24	NT	22	26	24	30	NT	28	24	24	NT	NR
S35	25/04/2011	B	CRS	<i>Citrobacter freundii</i>	9	12	23	6	34	23	22	21	11	19	25	30	28	24	26	24	32	NT	30	29	25	NT	NR
S36	25/04/2011	B	CRS	<i>Citrobacter youngae</i>	6	8	20	6	30	11	11	12	8	11	18	28	24	23	24	24	32	NT	30	28	24	NT	bla _{SHV-like}
S37	25/04/2011	B	CRS	<i>Morganella morganii</i>	6	13	24	6	34	18	19	24	18	18	28	32	28	24	28	24	34	NT	32	30	29	NT	NR
S38	25/04/2011	B	CRS	<i>Morganella morganii</i>	6	11	28	6	35	24	20	NT	14	22	28	30	23	24	24	20	26	NT	28	26	24	NT	NR
S39	25/04/2011	B	CRF	<i>Morganella morganii</i>	6	7	30	6	38	26	26	30	17	24	32	30	23	28	30	28	36	NT	34	30	30	NT	NR
S40	25/04/2011	B	CRS	<i>Morganella morganii</i>	8	12	24	6	34	23	22	NT	18	22	28	29	20	22	24	26	30	NT	28	24	26	NT	NR

Isolado	Data do Isolamento	Local	Fonte de Isolamento	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																	Diversidade genética						
					AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV		ENO	OFX	MXF ^a	NA	CIP	
					R ≤ 13	R ≤ 11	R ≤ 17	R ≤ 14	R ≤ 14	R ≤ 22	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 14	R ≤ 17	R ≤ 17	R ≤ 19	R ≤ 12	R ≤ 12	R ≤ 14	R ≤ 13	R ≤ 15		R ≤ 12	R ≤ 16	R ≤ 13	R ≤ 15	R ≤ 13	R ≤ 15
					S ≥ 18	S ≥ 15	S ≥ 21	S ≥ 18	S ≥ 18	S ≥ 26	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 18	S ≥ 21	S ≥ 21	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 15	S ≥ 15	S ≥ 17	S ≥ 17		S ≥ 21	S ≥ 16	S ≥ 20	S ≥ 19	S ≥ 21	
S41	25/04/2011	B	CRB	NR	14	18	28	13	34	30	23	NT	20	28	30	30	26	24	24	30	NT	26	28	22	NT	NR		
S42	25/04/2011	B	CRB	NR	26	20	29	28	36	36	28	NT	28	32	36	33	30	26	28	28	32	NT	28	28	24	NT	NR	
S43	25/04/2011	B	CRB	NR	28	26	32	24	33	36	30	NT	34	24	36	30	26	23	25	23	32	NT	28	28	22	NT	NR	
S44	25/04/2011	B	CRF	NR	12	22	29	14	35	33	28	29	17	29	32	34	30	26	24	25	30	NT	26	28	24	NT	NR	
S45	25/04/2011	B	CRF	NR	10	22	28	12	35	34	24	30	6	29	36	34	25	23	26	25	35	NT	32	30	28	NT	NR	
S46	25/04/2011	B	CRF	NR	20	19	26	12	34	34	26	30	12	29	35	32	28	24	26	24	30	NT	28	29	24	NT	NR	
S47	25/04/2011	B	CRS	NR	26	22	28	24	34	34	28	34	26	30	36	34	30	24	25	23	32	NT	28	30	25	NT	NR	
S48	25/04/2011	B	CRS	NR	12	20	26	8	32	32	26	28	12	24	33	32	26	22	23	20	26	NT	25	23	20	NT	NR	
S49	25/04/2011	B	CRF	<i>Citrobacter youngae</i>	6	6	26	11	28	29	24	29	6	6	30	15	26	22	24	18	23	NT	17	12	20	NT	<i>qnrB</i>	
S50	25/04/2011	B	CRF	NR	13	18	24	12	30	28	24	28	11	24	22	30	26	22	23	20	23	NT	24	20	19	NT	NR	
S51	25/04/2011	B	CRF	<i>Citrobacter youngae</i>	11	20	25	14	34	6	6	10	6	29	34	34	26	23	24	23	23	NT	23	20	19	NT	<i>bla</i> _{SHV-like}	
S52	25/04/2011	B	CRF	NR	24	22	30	21	32	34	30	36	22	33	38	30	25	24	26	20	36	NT	34	30	24	NT	NR	
S53	25/04/2011	B	CRF	NR	24	22	28	10	30	34	28	36	23	32	36	29	23	22	25	23	34	NT	32	26	22	NT	NR	
S54	25/04/2011	B	CRB	NR	12	18	23	18	30	26	22	25	6	23	24	30	22	17	12	19	25	NT	15	18	16	NT	<i>qnrB</i>	
S55	25/04/2011	B	CRB	NR	26	24	29	20	31	18	14	36	22	32	38	31	24	24	22	20	34	NT	32	28	23	NT	NR	
S56	25/04/2011	B	CRB	NR	22	9	34	24	34	38	32	40	18	35	40	34	25	22	26	24	34	NT	32	26	21	NT	NR	
S57	25/04/2011	B	CRB	NR	23	22	30	18	29	34	23	35	22	30	30	30	23	22	26	23	32	NT	34	28	22	NT	NR	
S58	25/04/2011	B	CRS	NR	6	12	26	6	30	28	23	21	6	26	28	28	22	20	16	18	25	NT	29	24	11	NT	Negativo <i>qnr</i>	
S59	11/07/2011	C	CRS	NR	18	12	26	16	32	32	26	30	12	28	32	28	30	18	23	23	26	18	NT	19	17	NT	Negativo <i>qnr</i>	
S60	11/07/2011	C	CRB	NR	30	16	35	24	34	NT	36	40	24	32	NT	34	30	20	24	26	38	NT	NT	32	24	NT	NR	
S61	11/07/2011	C	CRB	NR	16	23	28	13	30	NT	26	30	13	28	NT	30	29	20	24	23	30	NT	NT	24	23	NT	NR	
S62	11/07/2011	C	CRB	NR	26	26	36	6	14	36	32	36	24	30	42	30	30	23	24	22	32	29	NT	30	24	NT	NR	
S63	11/07/2011	C	CRB	NR	9	17	25	12	28	30	25	28	6	27	31	28	26	20	NT	21	30	31	NT	NT	23	NT	NR	
S64	11/07/2011	C	CRB	NR	8	16	25	10	30	30	24	28	6	25	30	26	24	18	NT	19	28	28	NT	NT	21	NT	NR	
S65	11/07/2011	C	CRB	NR	6	24	28	16	34	32	26	30	6	24	32	14	29	23	24	24	28	24	NT	26	18	NT	Negativo <i>qnr</i>	
S66	11/07/2011	C	CRB	NR	26	24	30	20	36	34	30	34	28	30	34	30	32	20	23	22	30	24	NT	24	20	NT	NR	
S67	11/07/2011	C	CRB	NR	16	19	26	12	30	30	24	30	6	26	28	30	25	23	20	20	32	28	30	30	24	NT	NR	
S68	11/07/2011	C	CRB	<i>Citrobacter freundii</i>	6	6	18	6	26	14	9	10	6	6	17	18	24	23	18	23	29	28	30	28	23	NT	<i>bla</i> _{SHV-like}	
S69	11/07/2011	C	CRB	<i>Serratia marcescens</i>	6	6	24	6	28	24	14	24	6	24	28	20	24	16	11	6	25	18	20	17	23	NT	Negativo <i>qnr</i>	
S70	11/07/2011	C	CRB	NR	6	10	28	6	24	6	27	30	16	30	36	30	28	26	24	25	30	25	29	26	26	NT	NR	
S71	11/07/2011	C	CRB	NR	6	6	28	6	35	30	26	30	18	32	34	24	24	23	20	24	28	24	26	23	24	NT	NR	
S72	11/07/2011	C	CRB	NR	29	22	30	26	36	36	30	34	30	30	36	30	34	22	24	24	32	31	NT	30	28	NT	NR	
S73	11/07/2011	C	CRB	NR	24	20	26	26	34	36	26	32	26	32	36	30	32	20	24	24	28	NT	NT	28	20	NT	NR	
S74	11/07/2011	C	CRB	NR	30	18	32	26	36	38	30	36	30	34	40	32	36	20	24	22	20	NT	NT	23	25	NT	NR	
S75	11/07/2011	C	CRB	NR	26	18	30	25	36	NT	6	34	30	32	NT	32	32	20	24	24	32	NT	NT	30	26	NT	NR	
S76	11/07/2011	C	CRB	NR	24	16	32	28	40	42	32	36	30	36	42	34	36	20	24	20	32	NT	NT	30	30	NT	NR	
S77	11/07/2011	C	CRB	NR	28	20	30	17	35	36	30	30	26	32	36	30	30	20	24	23	40	NT	NT	34	30	NT	NR	
S78	11/07/2011	C	CRB	NR	16	19	24	12	34	30	25	30	6	24	30	25	24	24	23	23	29	25	28	25	24	NT	NR	
S79	11/07/2011	C	CRB	NR	16	9	25	12	28	30	22	26	20	24	26	26	26	23	23	22	30	24	25	26	24	NT	NR	
S80	11/07/2011	C	CRB	NR	30	28	36	26	36	NT	36	34	26	12	NT	32	32	23	28	24	38	NT	NT	34	24	NT	NR	

Isolado	Data do Isolamento	Local	Fonte de Isolamento	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																			Diversidade genética				
					AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	EIP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO	OFX		MXF ^a	NA	CIP	
					R ≤ 13	R ≤ 11	R ≤ 17	R ≤ 14	R ≤ 14	R ≤ 22	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 14	R ≤ 17	R ≤ 17	R ≤ 19	R ≤ 12	R ≤ 12	R ≤ 14	R ≤ 13	R ≤ 15	R ≤ 12	R ≤ 16		R ≤ 13	R ≤ 15	R ≤ 13	R ≤ 15
					S ≥ 18	S ≥ 15	S ≥ 21	S ≥ 18	S ≥ 18	S ≥ 26	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 18	S ≥ 21	S ≥ 21	S ≥ 23	S ≥ 15	S ≥ 15	S ≥ 17	S ≥ 17	S ≥ 21	S ≥ 16	S ≥ 20		S ≥ 19	S ≥ 21	S ≥ 21	S ≥ 21
S81	11/07/2011	C	CRB	NR	28	22	36	24	38	40	36	42	28	34	46	32	34	22	24	23	36	30	30	30	23	NT	NR	
S82	11/07/2011	C	CRB	NR	6	24	26	26	30	NT	32	36	24	30	NT	30	32	20	24	24	36	NT	NT	30	24	NT	NR	
S83	11/07/2011	C	CRB	NR	30	28	35	24	36	36	32	38	25	35	44	30	30	24	25	22	34	29	30	30	24	NT	NR	
S84	11/07/2011	C	CRB	NR	30	26	35	28	34	NT	35	26	28	17	NT	34	30	22	25	24	38	NT	NT	32	26	NT	NR	
S85	11/07/2011	C	CRB	NR	28	26	34	26	30	NT	30	36	24	32	NT	30	28	22	24	23	40	NT	NT	34	26	NT	NR	
S86	11/07/2011	C	CRB	<i>Citrobacter freundii</i>	20	23	30	20	23	36	29	32	26	32	32	32	36	20	24	23	32	32	30	30	24	NT	NR	
S87	11/07/2011	C	CRB	NR	23	24	30	22	33	36	29	37	23	30	36	27	24	24	25	22	34	28	32	30	26	NT	NR	
S88	11/07/2011	C	CRS	<i>Citrobacter youngae</i>	6	6	18	6	26	6	9	8	6	8	14	24	24	22	23	23	26	23	24	23	22	NT	<i>bla</i> _{TEM-1}	
S89	11/07/2011	C	CRS	NR	16	16	26	12	34	29	24	29	6	28	31	30	25	23	24	23	24	24	24	24	20	NT	NR	
S90	11/07/2011	C	CRS	NR	7	12	26	6	30	24	18	30	6	26	18	24	26	24	24	30	30	30	30	24	NT	NR	NR	
S91	11/07/2011	C	CRS	NR	24	17	26	22	30	NT	26	30	23	26	NT	30	30	18	24	16	30	29	NT	26	25	NT	NR	
S92	11/07/2011	C	CRS	NR	6	20	26	24	34	34	28	32	26	30	35	29	30	22	24	23	32	29	29	30	23	NT	NR	
S93	11/07/2011	C	CRS	NR	26	19	26	24	32	32	28	34	28	30	34	29	35	18	24	22	28	28	NT	28	22	NT	NR	
S94	23/08/2011	D	CRF	<i>Escherichia coli</i>	8	6	20	6	27	22	20	24	12	17	19	24	28	21	NT	19	22	19	NT	NT	6	NT	<i>oqxAB</i> / Negativo <i>qnr</i>	
S95	23/08/2011	D	CRF	NR	24	14	26	21	30	32	25	30	24	24	32	28	30	24	NT	24	27	27	NT	NT	21	NT	NR	
S96	23/08/2011	D	CRF	NR	24	12	28	16	30	35	30	30	24	30	30	28	30	20	NT	22	34	34	NT	30	30	NT	NR	
S97	23/08/2011	D	CRF	NR	7	10	28	6	30	30	25	30	6	28	32	20	22	20	NT	20	30	30	NT	27	24	NT	NR	
S98	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S96																			NT	NR			
S99	23/08/2011	D	CRF	NR	6	6	30	16	32	36	29	38	10	31	38	24	24	20	NT	22	35	34	NT	NT	35	NT	NR	
S100	23/08/2011	D	CRF	NR	18	20	24	8	30	29	23	28	23	26	30	29	29	22	NT	22	28	26	NT	NT	22	NT	NR	
S101	23/08/2011	D	CRF	NR	12	6	24	6	30	32	20	28	21	28	36	23	27	18	NT	22	30	30	NT	26	32	NT	NR	
S102	23/08/2011	D	CRF	<i>Aeromonas sobria</i>	14	6	30	6	32	34	28	36	24	30	36	18	22	18	NT	20	36	36	NT	30	35	NT	NR	
S103	23/08/2011	D	CRF	NR	32	28	36	28	34	39	33	39	26	34	38	32	30	22	NT	21	36	NT	NT	22	NT	NT	NR	
S104	23/08/2011	D	CRF	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	12	22	18	28	30	24	28	22	24	28	26	29	18	NT	18	18	15	NT	16	12	NT	<i>qnrB19</i> / <i>oqxAB</i>	
S105	23/08/2011	D	CRF	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	6	20	6	13	10	9	9	25	20	17	22	26	10	NT	20	20	16	NT	16	16	NT	<i>bla</i> _{CTX-M-2} / <i>bla</i> _{SHV-11} / <i>bla</i> _{TEM-1} / <i>qnrS1</i> / <i>oqxAB</i>	
S106	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S105																			NT	NR			
S107	23/08/2011	D	CRF	NR	8	19	24	6	29	29	24	28	6	26	30	26	21	18	NT	18	30	26	NT	NT	21	NT	NR	
S108	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S107																			NT	NR			
S109	23/08/2011	D	CRF	<i>Citrobacter freundii</i>	20	23	6	14	30	30	24	29	14	26	30	34	26	26	NT	22	24	21	NT	NT	6	NT	<i>qnrB</i>	
S110	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S109																			NT	NR			
S111	23/08/2011	D	CRF	NR	32	26	30	30	32	36	30	36	25	30	36	30	24	22	NT	21	36	NT	NT	NT	21	NT	NR	
S112	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S111																			NT	NR			
S113	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S105																			NT	NR			
S114	23/08/2011	D	CRF	NR	28	27	34	22	34	36	32	38	26	34	40	32	28	22	NT	22	36	28	NT	NT	22	NT	NR	
S115	23/08/2011	D	CRF	NR	28	23	12	6	32	34	30	35	30	32	36	35	32	20	NT	23	30	30	NT	NT	28	NT	NR	
S116	23/08/2011	D	CRF	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	13	18	6	16	14	12	13	24	17	22	22	29	18	NT	20	24	24	NT	NT	22	NT	<i>bla</i> _{SHV-2}	
S117	23/08/2011	D	CRF	NR	24	23	30	22	30	36	30	36	24	30	36	30	23	22	NT	21	19	NT	NT	NT	6	NT	Negativo <i>qnr</i>	
S118	23/08/2011	D	CRF	NR	20	22	28	8	31	32	26	30	29	30	32	29	30	20	NT	22	26	26	NT	NT	24	NT	NR	
S119	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S118																			NT	NR			
S120	23/08/2011	D	CRF	NR	23	18	29	6	30	32	29	32	30	30	36	29	29	18	NT	20	30	29	NT	NT	28	NT	NR	

Isolado	Data do Isolamento	Local	Fonte de Isolamento	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																		Diversidade genética				
					AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	EP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO		OFX	MXF ^a	NA	CIP
					R ≤ 13	R ≤ 11	R ≤ 17	R ≤ 14	R ≤ 14	R ≤ 22	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 14	R ≤ 17	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 12	R ≤ 12	R ≤ 14	R ≤ 13	R ≤ 15		R ≤ 12	R ≤ 16	R ≤ 13	R ≤ 15
					S ≥ 18	S ≥ 15	S ≥ 21	S ≥ 18	S ≥ 18	S ≥ 26	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 18	S ≥ 21	S ≥ 21	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 15	S ≥ 17	S ≥ 17	S ≥ 21	S ≥ 16		S ≥ 20	S ≥ 19	S ≥ 21	
S121	23/08/2011	D	CRF	NR	24	22	28	25	30	36	30	36	30	34	34	36	32	22	NT	22	30	32	NT	NT	28	NT	NR
S122	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S121																		NT	NR			
S123	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S121																		NT	NR			
S124	23/08/2011	D	CRF	NR	27	27	32	30	36	36	30	36	32	36	38	36	32	22	NT	21	30	NT	NT	NT	27	NT	NR
S125	23/08/2011	D	CRF	NR	28	20	30	18	28	34	26	32	30	30	32	34	30	20	NT	19	30	NT	NT	NT	24	NT	NR
S126	23/08/2011	D	CRF	NR	15	6	30	30	36	38	34	38	36	32	38	22	23	21	NT	22	30	25	NT	NT	6	NT	Negativo <i>qnr</i>
S127	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S126																		NT	NR			
S128	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S124																		NT	NR			
S129	23/08/2011	D	CRF	NR	14	7	30	14	34	34	NT	34	26	30	38	30	32	21	NT	22	32	28	30	26	8	NT	Negativo <i>qnr</i>
S130	23/08/2011	D	CRF	NR	11	18	30	12	36	36	30	34	8	26	36	34	28	22	NT	22	32	32	NT	NT	26	NT	NR
S131	23/08/2011	D	CRF	NR	24	19	25	21	34	36	NT	30	24	26	28	30	30	20	NT	20	26	NT	NT	NT	22	NT	NR
S132	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S131																		NT	NR			
S133	23/08/2011	D	CRF	NR	24	23	36	30	34	36	30	36	32	32	36	36	36	22	NT	20	24	17	NT	NT	6	NT	Negativo <i>qnr</i>
S134	23/08/2011	D	CRF	NR	12	6	25	24	30	32	24	35	30	26	36	21	20	18	NT	18	24	NT	NT	NT	6	NT	Negativo <i>qnr</i>
S135	23/08/2011	D	CRF	NR	16	10	28	16	34	36	NT	38	22	31	36	28	26	20	NT	21	34	32	32	30	34	NT	NR
S136	23/08/2011	D	CRF	NR	11	12	30	6	36	32	27	30	26	26	36	33	32	24	NT	25	36	NT	NT	NT	30	NT	NR
S137	23/08/2011	D	CRF	<i>Escherichia coli</i>	16	10	26	6	18	15	14	14	29	26	21	32	32	22	NT	22	30	30	NT	NT	22	NT	<i>bla</i> _{CTX-M-2-like} / <i>bla</i> _{TEM-1}
S138	23/08/2011	D	CRF	NR	9	6	26	6	32	32	23	30	25	28	32	18	21	20	NT	20	24	NT	NT	NT	6	NT	Negativo <i>qnr</i>
S139	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S137																		NT	NR			
S140	23/08/2011	D	CRF	NR	12	24	30	18	36	36	28	32	14	30	34	36	27	24	NT	24	32	30	NT	NT	28	NT	NR
S141	23/08/2011	D	CRF	NR	26	24	30	18	30	34	NT	36	24	32	36	30	26	21	NT	21	34	30	33	30	22	NT	NR
S142	23/08/2011	D	CRF	NR	28	24	32	18	33	36	NT	36	24	32	39	34	26	21	NT	22	38	32	36	34	24	NT	NR
S143	23/08/2011	D	CRF	<i>Escherichia coli</i>	23	23	30	20	34	33	NT	30	27	30	34	34	30	22	NT	22	24	22	20	22	8	NT	<i>oqxAB</i> / Negativo <i>qnr</i>
S144	23/08/2011	D	CRF	NR	10	12	30	6	32	26	NT	25	18	24	32	30	28	23	NT	24	36	30	32	32	24	NT	NR
S145	23/08/2011	D	CRF	NR	15	19	27	8	35	30	NT	27	21	26	32	33	30	21	NT	22	30	30	30	28	25	NT	NR
S146	23/08/2011	D	CRF	NR	28	26	32	24	34	37	NT	36	24	33	38	32	28	21	NT	21	36	28	32	28	21	NT	NR
S147	23/08/2011	D	CRF	<i>Aeromonas sobria</i>	14	6	24	25	32	36	NT	36	30	30	36	18	19	20	NT	21	23	18	22	17	6	NT	<i>qnrA</i> / <i>qnrS</i>
S148	23/08/2011	D	CRF	NR	28	26	35	29	36	40	NT	38	25	35	42	32	29	20	NT	20	36	30	36	30	22	NT	NR
S149	23/08/2011	D	CRF	<i>Proteus mirabilis</i>	26	24	30	20	32	36	NT	36	24	32	36	30	24	22	NT	22	24	12	18	14	6	NT	Negativo <i>qnr</i>
S150	23/08/2011	D	CRF	NR	18	8	25	26	32	36	NT	41	34	30	36	21	19	20	NT	22	29	26	26	24	7	NT	Negativo <i>qnr</i>
S151	23/08/2011	D	CRF	NR	24	22	24	20	32	32	NT	30	25	28	30	30	28	13	NT	18	25	26	24	23	22	NT	NR
S152	23/08/2011	D	CRF	NR	29	29	32	22	32	36	NT	38	24	32	36	30	24	14	NT	19	23	12	18	13	6	NT	Negativo <i>qnr</i>
S153	23/08/2011	D	CRF	NR	16	7	19	6	34	36	NT	36	24	30	36	24	24	23	NT	24	24	24	23	22	10	NT	Negativo <i>qnr</i>
S154	23/08/2011	D	CRF	NR	28	26	34	22	34	36	NT	36	24	36	40	32	26	21	NT	21	34	30	32	30	23	NT	NR
S155	23/08/2011	D	CRF	NR	26	26	35	22	34	36	NT	36	22	32	38	32	26	20	NT	20	34	30	32	30	20	NT	NR
S156	23/08/2011	D	CRF	NR	24	24	30	24	32	36	NT	36	24	32	36	30	24	20	NT	20	34	28	32	30	21	NT	NR
S157	23/08/2011	D	CRF	NR	26	25	32	26	34	36	NT	36	24	32	38	32	26	21	NT	22	35	29	31	29	21	NT	NR
S158	23/08/2011	D	CRF	NR	23	23	31	14	34	35	NT	34	26	32	34	36	32	20	NT	21	12	8	12	14	6	NT	Negativo quinolonas
S159	23/08/2011	D	CRF	NR	16	8	27	10	32	36	NT	38	30	32	36	26	27	21	NT	22	30	28	28	24	6	NT	Negativo <i>qnr</i>
S160	23/08/2011	D	CRF	NR	28	27	36	28	35	38	NT	38	24	34	40	34	28	20	NT	20	36	29	32	30	21	NT	NR

Isolado	Data do Isolamento	Local	Fonte de Isolamento	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																	Diversidade genética					
					AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV		ENO	OFX	MXF ^a	NA	CIP
					R ≤ 13	R ≤ 11	R ≤ 17	R ≤ 14	R ≤ 14	R ≤ 22	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 14	R ≤ 17	R ≤ 17	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 12	R ≤ 12	R ≤ 14	R ≤ 13		R ≤ 15	R ≤ 12	R ≤ 16	R ≤ 13	R ≤ 15
S ≥ 18	S ≥ 15	S ≥ 21	S ≥ 18	S ≥ 18	S ≥ 26	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 18	S ≥ 21	S ≥ 21	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 15	S ≥ 17	S ≥ 21	S ≥ 16	S ≥ 20	S ≥ 19	S ≥ 21								
S161	23/08/2011	D	CRF	NR	24	18	24	22	34	32	NT	32	26	28	32	30	26	20	NT	20	26	26	24	21	NT	NR	
S162	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S161																	NT	NR				
S163	23/08/2011	D	CRF	NR	25	12	24	18	34	32	NT	30	26	26	30	35	30	20	NT	22	24	26	24	22	22	NT	NR
S164	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S163																	NT	NR				
S165	23/08/2011	D	CRF	NR	25	24	30	23	30	35	NT	35	23	30	35	30	25	19	NT	20	32	28	30	28	18	NT	Negativo <i>qnr</i>
S166	23/08/2011	D	CRF	NR	22	22	30	20	34	32	NT	32	24	30	33	34	30	21	NT	22	32	30	30	30	20	NT	NR
S167	23/08/2011	D	CRF	NR	27	26	34	26	34	38	NT	38	26	34	39	32	26	20	NT	20	34	30	34	32	22	NT	NR
S168	23/08/2011	D	CRF	NR	28	28	34	24	36	38	NT	38	24	34	40	32	26	22	NT	21	34	28	30	30	19	NT	NR
S169	23/08/2011	D	CRF	NR	22	22	28	19	34	34	NT	30	26	30	34	32	26	18	NT	22	22	20	22	7	NT	Negativo <i>qnr</i>	
S170	23/08/2011	D	CRF	NR	22	22	28	17	32	32	NT	30	27	28	30	34	30	23	NT	21	22	18	19	20	6	NT	Negativo <i>qnr</i>
S171	23/08/2011	D	CRF	NR	29	28	34	26	33	36	NT	36	25	33	38	32	26	21	NT	20	34	29	32	29	22	NT	NR
S172	23/08/2011	D	CRF	NR	27	26	34	25	35	38	NT	36	24	33	38	32	29	21	NT	20	35	30	32	30	22	NT	NR
S173	23/08/2011	D	CRF	NR	27	26	32	26	34	37	NT	37	24	32	38	30	24	19	NT	19	35	30	31	29	20	NT	NR
S174	23/08/2011	D	CRF	NR	24	23	30	22	32	35	NT	35	19	30	36	30	21	18	NT	17	35	28	34	30	22	NT	NR
S175	23/08/2011	D	CRF	NR	27	27	34	27	35	38	NT	37	24	33	40	32	28	21	NT	22	34	30	32	30	22	NT	NR
S176	23/08/2011	D	CRF	NR	28	26	34	28	34	38	NT	38	26	33	38	32	26	21	NT	21	34	28	34	32	20	NT	NR
S177	23/08/2011	D	CRF	NR	28	26	34	30	36	40	NT	40	26	34	40	30	24	20	NT	20	32	28	32	30	20	NT	NR
S178	23/08/2011	D	CRF	<i>Escherichia coli</i>	24	24	28	20	32	32	NT	30	28	30	34	32	28	22	NT	22	25	20	20	20	7	NT	<i>oqxAB</i> / Negativo <i>qnr</i>
S179	23/08/2011	D	CRF	NR	30	26	32	20	32	34	NT	32	24	32	34	36	34	24	NT	25	34	36	32	34	28	NT	NR
S180	23/08/2011	D	CRF	NR	Mesma cepa que S179																	NT	NR				
S181	23/08/2011	D	CRF	NR	26	26	36	24	36	40	NT	40	24	34	38	32	26	20	NT	18	36	26	34	30	20	NT	NR
S182	23/08/2011	D	CRF	NR	30	30	36	24	36	40	NT	40	26	38	44	32	30	18	NT	18	34	28	34	32	21	NT	NR
S183	23/08/2011	D	CRF	<i>Escherichia coli</i>	22	22	30	18	36	34	NT	32	26	30	32	36	30	22	NT	22	24	19	21	6	NT	<i>oqxAB</i> / Negativo <i>qnr</i>	
S184	23/08/2011	D	CRF	NR	28	26	30	22	34	36	NT	38	24	33	38	32	24	19	NT	19	38	32	36	32	24	NT	NR
S185	23/08/2011	D	CRF	NR	28	27	34	24	34	38	NT	38	24	34	40	32	28	21	NT	22	36	30	32	30	18	NT	Negativo <i>qnr</i>
S186	23/08/2011	D	CRF	NR	19	16	27	12	30	32	NT	32	25	30	32	32	30	19	NT	19	23	20	22	24	14	NT	Negativo <i>qnr</i>
S187	20/03/2012	E	CRS	NR	7	10	25	6	26	22	18	22	14	20	28	25	21	10	15	19	24	14	21	15	6	0,5	Negativo ESBL e <i>qnr</i>
S188	20/03/2012	E	CRS	NR	14	18	30	14	32	34	31	34	26	30	38	30	26	10	21	22	6	6	6	6	4*	Negativo <i>qnr</i>	
S189	20/03/2012	E	CRS	NR	24	24	30	23	30	32	30	36	24	32	37	30	24	19	21	20	30	30	33	30	24	0,015*	NR
S190	20/03/2012	E	CRS	NR	7	6	21	14	30	34	25	32	21	28	36	20	21	18	20	18	23	23	22	20	24	0,12*	NR
S191A	20/03/2012	E	CRS	NR	24	24	26	22	28	30	24	31	23	27	33	25	22	19	22	20	12	6	8	6	6	2*	Negativo <i>qnr</i>
S191B	20/03/2012	E	CRS	NR	25	24	28	20	28	30	26	30	22	28	34	24	18	18	24	19	12	6	6	6	6	4*	Negativo <i>qnr</i>
S192	20/03/2012	E	CRS	NR	11	10	23	16	30	30	24	30	24	26	32	32	30	10	16	24	10	8	9	9	6	4*	Negativo quinolonas
S193	20/03/2012	E	CRS	NR	13	12	28	20	32	32	27	32	26	28	34	33	30	10	18	24	13	8	7	8	6	2*	Negativo <i>qnr</i>
S194	20/03/2012	E	CRS	NR	26	24	32	24	33	34	33	36	26	34	40	30	24	23	24	24	10	6	6	6	6	4*	Negativo <i>qnr</i>
S195	20/03/2012	E	CRS	NR	24	18	32	22	34	36	40	32	26	30	38	30	24	22	24	22	38	33	38	33	26	0,004*	NR
S196	20/03/2012	E	CRS	NR	6	6	34	6	30	20	19	18	6	30	28	22	28	22	30	26	28	22	22	24	12	0,12*	Negativo ESBL e <i>qnr</i>
S197	20/03/2012	E	CRS	NR	24	24	30	20	30	34	36	32	24	30	36	28	24	22	26	22	36	30	32	30	25	0,015*	NR
S198	20/03/2012	E	CRS	NR	16	14	26	18	31	30	25	32	26	28	34	30	33	10	18	22	10	8	7	8	6	2*	Negativo <i>qnr</i>
S199	20/03/2012	E	CRS	NR	24	22	30	24	30	34	30	36	26	30	37	26	24	20	24	20	36	30	30	28	24	0,008*	NR

Isolado	Data do Isolamento	Local	Fonte de Isolamento	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																	Diversidade genética					
					AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV		ENO	OFX	MXF ^a	NA	CIP
					R ≤ 13 S ≥ 18	R ≤ 11 S ≥ 15	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 22 S ≥ 26	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 14 S ≥ 18	R ≤ 17 S ≥ 21	R ≤ 17 S ≥ 23	R ≤ 19 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 12 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 13 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 21		R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 16 S ≥ 20	R ≤ 13 S ≥ 19	R ≤ 15 S ≥ 21	
S200	20/03/2012	E	CRS	NR	28	26	34	22	34	36	33	36	26	34	42	32	30	21	24	22	36	32	38	34	28	0,008*	NR
S201	20/03/2012	E	CRS	<i>Salmonella</i> spp.	14	14	20	15	28	26	21	27	24	24	29	30	30	10	18	18	10	8	9	8	6	4*	<i>qnrB</i> / Negativo ESBL
S202	20/03/2012	E	CRS	NR	21	22	26	18	26	30	28	31	21	26	31	24	20	19	20	19	27	18	24	21	18	0,25*	Negativo <i>qnr</i>
S203	20/03/2012	E	CRS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	18	22	20	28	28	24	28	23	24	27	22	24	17	18	18	18	18	17	16	15	0,5*	<i>qnrB2</i>
S204	20/03/2012	E	CRS	<i>Salmonella</i> spp.	14	13	22	16	28	26	22	28	24	24	30	30	30	12	18	22	10	7	7	7	6	4*	<i>qnrB</i> / Negativo ESBL
S205	20/03/2012	E	CRS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	16	24	19	30	28	22	30	24	24	29	27	29	12	19	18	18	17	17	15	18	0,5*	<i>bla</i> _{SHV-1} / <i>qnrB2</i>
S206	20/03/2012	E	CRS	NR	6	16	22	6	26	24	20	24	6	22	28	24	20	18	18	17	30	28	28	29	22	0,008*	Negativo ESBL e <i>qnr</i>
S207	20/03/2012	E	CRS	NR	21	16	24	21	30	30	24	29	23	25	30	26	24	15	18	18	30	27	24	24	20	0,03*	NR
S208	20/03/2012	E	CRS	NR	17	18	24	20	26	30	23	25	22	24	27	27	25	17	18	18	22	22	21	20	20	0,03*	NR
S209	20/03/2012	E	CRS	NR	7	6	20	24	32	36	32	40	30	30	36	19	9	17	18	18	23	19	21	18	6	0,12*	Negativo <i>qnr</i>
S210	20/03/2012	E	CRS	NR	20	22	26	18	26	30	28	30	22	28	32	24	19	16	20	19	34	28	32	30	21	0,015*	NR
S212	20/03/2012	E	CRS	NR	13	12	24	12	24	28	24	30	22	26	31	24	22	8	18	18	11	6	6	6	6	2*	Negativo <i>qnr</i>
S215	20/03/2012	E	CRS	NR	6	6	27	14	32	36	25	35	20	30	36	24	22	20	21	21	25	25	25	22	26	0,25*	NR
S221	20/03/2012	E	CRS	NR	7	7	30	6	26	18	14	20	7	26	24	28	26	19	27	24	26	21	23	22	9	0,12*	Negativo ESBL e <i>qnr</i>
S222	20/03/2012	E	CRS	<i>Escherichia coli</i>	21	15	26	18	31	30	24	30	24	28	30	30	31	19	20	18	12	8	9	9	6	4*	Negativo quinolonas
S223	20/03/2012	E	CRS	<i>Escherichia coli</i>	18	15	26	18	30	30	24	30	24	28	30	32	30	18	20	20	13	9	9	9	6	4*	Negativo <i>qnr</i>
S224	20/03/2012	E	CRS	NR	10	10	24	6	30	27	24	26	6	25	30	26	23	18	20	18	26	30	26	24	22	0,008*	NR
S225	20/03/2012	E	CRS	NR	24	18	24	22	30	30	24	30	24	28	32	32	30	18	21	21	30	30	28	24	24	0,015*	NR
Ec1	16/11/2010	A	CRS	NR	22	22	30	18	30	30	NT	30	14	26	32	26	28	20	22	22	30	NT	30	24	22	NT	NR
Ec2	16/11/2010	A	CRS	NR	22	24	30	18	32	34	NT	30	12	26	32	28	28	18	20	22	30	NT	34	30	26	NT	NR
Ec3	16/11/2010	A	CRS	NR	24	24	28	28	32	30	NT	34	16	28	32	30	30	20	22	24	30	NT	30	26	26	NT	NR
Ec4	14/03/2011	A	CRF	NR	9	13	23	NT	25	28	23	25	7	25	NT	19	21	18	23	20	27	20	25	25	19	NT	Negativo <i>qnr</i>
Ec5	14/03/2011	A	CRF	NR	12	16	26	15	26	28	25	28	9	28	32	20	21	22	24	19	25	26	25	25	19	NT	Negativo <i>qnr</i>
Ec6	14/03/2011	A	CRF	NR	19	18	26	17	24	25	25	28	22	25	30	24	25	20	19	20	29	27	30	28	24	NT	NR
Ec7	14/03/2011	A	CRF	NR	12	22	25	12	25	28	29	27	12	28	34	24	20	19	20	21	35	28	34	32	26	NT	NR
Ec8	14/03/2011	A	CRF	NR	18	17	23	16	25	26	26	27	21	26	30	21	20	18	20	18	28	27	26	26	25	NT	NR
Ec9	14/03/2011	A	CRF	NR	8	16	25	18	24	26	25	24	10	24	32	24	20	20	20	20	28	26	26	26	24	NT	NR
Ec10	14/03/2011	A	CRF	NR	16	18	24	13	28	26	26	25	20	23	31	19	20	19	20	18	27	28	26	26	19	NT	NR
Ec11	04/04/2011	A	CRB	NR	21	11	20	18	30	28	23	28	22	26	30	26	29	17	18	20	24	NT	26	21	18	NT	Negativo <i>qnr</i>
Ec12	04/04/2011	A	CRB	NR	14	20	25	11	31	29	25	30	9	26	31	26	26	19	18	20	28	NT	26	24	23	NT	NR
Ec13	04/04/2011	A	CRB	NR	14	18	24	6	32	32	26	30	10	27	32	26	26	19	20	24	32	NT	30	26	22	NT	NR
Ec14	04/04/2011	A	CRB	NR	13	18	26	6	34	32	28	33	11	30	34	28	24	19	20	23	30	NT	29	27	22	NT	NR
Ec15	04/04/2011	A	CRB	NR	13	23	25	12	32	28	24	30	6	26	30	28	26	18	18	19	28	NT	18	24	16	NT	Negativo <i>qnr</i>
Ec16	04/04/2011	A	CRB	NR	14	20	23	11	32	28	24	28	10	24	28	26	24	16	19	20	26	NT	26	24	18	NT	Negativo <i>qnr</i>
Ec17	04/04/2011	A	CRB	NR	20	22	24	10	31	28	24	28	8	24	30	27	26	NT	18	18	28	NT	24	24	21	NT	NR
Ec18	04/04/2011	A	CRB	NR	18	18	24	6	30	26	24	26	10	24	30	24	30	NT	18	19	24	NT	22	18	20	NT	Negativo <i>qnr</i>
Ec19	04/04/2011	A	CRB	NR	14	20	26	12	34	30	25	30	8	28	30	32	24	22	23	23	27	NT	29	26	24	NT	NR
Ec20	04/04/2011	A	CRB	NR	18	20	26	12	32	30	26	30	9	28	31	26	27	NT	22	22	30	NT	30	24	24	NT	NR
Ec21	04/04/2011	A	CRB	NR	12	20	26	12	30	26	24	30	8	24	30	24	24	NT	14	6	24	12	30	19	7	NT	Negativo <i>qnr</i>
Ec22	04/04/2011	A	CRB	NR	20	22	27	16	30	30	28	30	24	27	34	27	26	15	18	12	22	NT	24	24	22	NT	NR

Isolado	Data do Isolamento	Local	Fonte de Isolamento	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																			Diversidade genética				
					AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO	OFX		MXF ^a	NA	CIP	
					R ≤ 13	R ≤ 11	R ≤ 17	R ≤ 14	R ≤ 14	R ≤ 22	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 14	R ≤ 17	R ≤ 17	R ≤ 19	R ≤ 12	R ≤ 12	R ≤ 14	R ≤ 13	R ≤ 15	R ≤ 12	R ≤ 16		R ≤ 13	R ≤ 15		
					S ≥ 18	S ≥ 15	S ≥ 21	S ≥ 18	S ≥ 18	S ≥ 26	S ≥ 23	S ≥ 18	S ≥ 21	S ≥ 21	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 15	S ≥ 15	S ≥ 17	S ≥ 17	S ≥ 21	S ≥ 16	S ≥ 20		S ≥ 19	S ≥ 21		
Ec23	04/04/2011	A	CRB	NR	16	22	24	14	32	30	24	28	6	28	25	32	24	23	24	24	29	NT	28	24	22	NT	NR	
Ec24	04/04/2011	A	CRB	NR	7	17	24	6	30	25	22	25	6	24	30	21	24	17	18	17	18	NT	22	20	10	NT	Negativo <i>qnr</i>	
Ec25	04/04/2011	A	CRB	NR	9	18	24	10	30	28	24	30	8	23	28	25	26	20	19	19	27	NT	28	28	19	NT	NR	
Ec26	04/04/2011	A	CRB	NR	7	10	24	6	28	26	23	25	6	24	29	16	22	20	18	17	20	NT	14	16	10	NT	Negativo <i>qnr</i>	
Ec27	25/04/2011	B	CRB	<i>Citrobacter braakii</i>	6	10	19	6	30	16	12	12	6	15	12	16	21	17	18	19	26	6	24	20	23	NT	<i>qnrB</i>	
Ec28	25/04/2011	B	CRB	<i>Citrobacter braakii</i>	6	6	19	6	31	24	17	16	6	19	24	14	26	16	21	20	24	6	24	21	22	NT	<i>qnrB</i>	
Ec29	25/04/2011	B	CRB	<i>Citrobacter freundii</i>	8	8	24	12	26	31	23	25	6	18	25	22	24	16	20	20	24	14	22	22	23	NT	<i>qnrB</i>	
Ec30	25/04/2011	B	CRB	<i>Citrobacter braakii</i>	12	18	27	12	28	30	24	30	6	28	30	25	30	18	23	18	30	12	25	22	23	NT	<i>qnrB</i>	
Ec31	25/04/2011	B	CRF	NR	16	20	25	14	31	30	26	30	8	24	28	24	29	16	18	18	27	22	27	23	24	NT	NR	
Ec32	25/04/2011	B	CRF	<i>Citrobacter diversus</i>	13	19	25	12	26	24	22	14	7	26	24	12	24	18	19	20	30	28	26	24	24	NT	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	
Ec33	25/04/2011	B	CRF	<i>Citrobacter freundii</i>	6	6	26	6	NT	25	20	23	6	23	17	18	24	17	18	19	28	NT	26	20	10	NT	<i>qnrB</i>	
Ec34	25/04/2011	B	CRF	NR	10	20	24	11	30	28	27	30	6	26	18	22	27	17	18	32	NT	29	25	25	NT	NR		
Ec35	25/04/2011	B	CRF	<i>Citrobacter braakii</i>	6	6	22	6	34	22	10	9	6	16	22	14	30	20	22	26	35	34	34	32	28	NT	NR	
Ec36	25/04/2011	B	CRS	NR	26	26	30	32	38	38	34	36	24	30	32	26	36	22	25	28	32	30	30	28	29	NT	NR	
Ec37	25/04/2011	B	CRS	<i>Citrobacter freundii</i>	12	16	26	6	26	28	24	28	6	24	28	21	24	18	18	20	24	NT	22	22	16	NT	<i>qnrB</i>	
Ec38	25/04/2011	B	CRS	NR	18	22	26	20	30	30	28	30	24	28	30	24	30	18	22	22	30	30	30	30	24	NT	NR	
Ec39	25/04/2011	B	CRS	NR	6	18	24	6	32	28	24	26	6	24	28	22	25	18	22	22	30	28	26	30	22	NT	NR	
Ec40	25/04/2011	B	CRS	NR	24	20	30	24	30	32	28	32	24	24	30	28	32	24	24	26	28	30	24	24	26	NT	NR	
Ec41	25/04/2011	B	CRS	NR	12	22	30	6	30	32	28	30	6	24	28	24	30	18	18	22	30	26	30	28	26	NT	NR	
Ec42	25/04/2011	B	CRB	NR	14	13	22	16	28	28	22	28	14	24	24	20	30	18	18	24	24	22	22	20	18	NT	Negativo <i>qnr</i>	
Ec43	11/07/2011	C	CRS	NR	11	26	32	14	40	36	30	32	8	30	36	26	32	25	29	28	38	38	NT	34	30	NT	NR	
Ec44	11/07/2011	C	CRS	NR	16	24	30	15	36	35	30	30	14	32	36	30	33	24	26	26	36	36	NT	30	22	NT	NR	
Ec45	11/07/2011	C	CRB	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	8	18	6	22	7	7	10	10	10	14	16	26	23	23	20	29	26	27	28	24	NT	<i>bla</i> _{SHV-like}	
Ec46	20/03/2012	E	CRS	NR	21	18	26	9	30	30	26	27	22	28	34	28	22	19	20	20	24	24	24	18	20	30	Negativo <i>qnr</i>	
Ec47	20/03/2012	E	CRS	<i>Aeromonas sobria</i>	12	6	26	15	39	42	31	40	36	38	38	10	16	18	20	15	24	23	19	20	10	26	Negativo <i>qnr</i>	
Ec48	20/03/2012	E	CRS	NR	15	24	36	6	36	33	30	34	21	32	36	34	24	22	24	22	30	28	28	24	24	32	NR	
Ec49	20/03/2012	E	CRS	<i>E. cloacae</i> spp. <i>dissolvens</i>	12	21	24	12	30	28	24	30	22	27	30	NT	24	16	18	18	24	24	17	19	20	0,008*	Negativo <i>qnr</i>	
Ec50	20/03/2012	E	CRS	<i>Escherichia coli</i>	22	18	30	20	34	36	30	34	28	33	35	NT	34	17	18	17	12	8	9	6	6	4*	Negativo <i>qnr</i>	
Ec51	20/03/2012	E	CRS	NR	10	6	30	6	30	36	30	36	24	30	34	16	16	18	20	18	24	24	23	22	9	25	Negativo <i>qnr</i>	
Ec53	20/03/2012	E	CRS	NR	8	16	30	6	30	32	29	32	18	30	34	30	18	18	20	20	24	29	29	24	24	34	NR	
Ec55	20/03/2012	E	CRS	NR	18	24	28	16	30	31	25	30	18	28	32	34	30	20	22	18	30	30	30	30	26	36	NR	
Lac1	16/11/2010	A	CRS	NR	10	10	26	6	28	26	NT	24	20	18	26	19	26	20	22	18	30	NT	28	24	24	NT	NR	
Lac2	16/11/2010	A	CRS	NR	18	18	24	12	28	30	NT	28	18	22	26	22	28	14	18	16	26	NT	26	26	22	NT	NR	
Lac3	16/11/2010	A	CRS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	22	25	18	28	30	NT	30	22	30	32	28	29	18	20	18	11	NT	8	10	6	NT	<i>oqxAB</i> / Negativo <i>qnr</i>	
Lac4	16/11/2010	A	CRS	<i>Raoultella planticola</i>	20	20	26	15	28	30	NT	30	22	24	24	18	26	6	16	16	14	NT	10	10	6	NT	Negativo <i>qnr</i>	
Lac5	16/11/2010	A	CRS	NR	20	20	28	22	30	30	NT	28	24	26	30	24	30	18	20	18	28	NT	26	26	24	NT	NR	
Lac6	16/11/2010	A	CRS	NR	22	20	26	22	28	30	NT	28	22	26	30	22	26	18	20	18	26	NT	26	24	22	NT	NR	
Lac7	14/03/2011	A	CRF	NR	8	10	23	6	28	24	22	27	6	27	30	23	25	19	18	20	26	NT	26	24	20	NT	NR	
Lac8	04/04/2011	A	CRB	NR	7	15	24	10	30	28	24	27	6	26	30	24	18	19	19	20	30	NT	28	24	22	NT	NR	
Lac9	04/04/2011	A	CRB	<i>Citrobacter braakii</i>	8	6	13	6	20	6	6	6	6	6	6	11	16	22	19	21	21	27	NT	26	24	21	NT	NR

Isolado	Data do Isolamento	Fonte de Local Isolamento	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																		Diversidade genética					
				AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	EIP	IPM	CN	TOB	AK	LEV	ENO		OFX	MXF ^a	NA	CIP	
				R ≤ 13	R ≤ 11	R ≤ 17	R ≤ 14	R ≤ 14	R ≤ 22	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 14	R ≤ 17	R ≤ 17	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 12	R ≤ 12	R ≤ 14	R ≤ 13	R ≤ 15		R ≤ 12	R ≤ 16	R ≤ 13	R ≤ 15	
				S ≥ 18	S ≥ 15	S ≥ 21	S ≥ 18	S ≥ 18	S ≥ 26	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 18	S ≥ 21	S ≥ 21	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 15	S ≥ 15	S ≥ 17	S ≥ 17	S ≥ 21		S ≥ 16	S ≥ 20	S ≥ 19	S ≥ 21	
Lac10	25/04/2011	B	CRB	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	6	6	26	6	34	30	24	24	6	28	36	13	20	22	24	22	30	28	30	24	30	NT	NR
Lac11	25/04/2011	B	CRB	<i>Citrobacter freundii</i>	6	18	26	12	32	30	NT	30	6	24	28	20	NT	20	20	22	26	6	NT	24	18	NT	<i>bla_{SHV-like}/qnrB</i>
Lac12	25/04/2011	B	CRF	<i>Providencia rettgeri</i>	6	10	22	6	30	28	22	28	18	22	28	18	24	18	18	22	26	24	22	24	16	NT	Negativo <i>qnr</i>
Lac13	25/04/2011	B	CRF	NR	6	6	26	6	26	28	24	28	16	26	28	18	24	18	18	20	26	22	26	24	24	NT	NR
Lac14	25/04/2011	B	CRF	NR	12	12	30	6	36	36	32	36	14	34	36	20	30	22	22	26	32	28	30	28	24	NT	NR
Lac15	25/04/2011	B	CRS	NR	24	18	28	6	36	34	26	32	18	28	32	18	30	18	18	20	30	25	26	24	20	NT	NR
Lac16	11/07/2011	C	CRS	NR	12	18	28	14	34	34	28	34	6	30	35	29	26	22	23	23	34	30	30	32	24	NT	NR
Lac17	11/07/2011	C	CRS	<i>Citrobacter braakii</i>	6	6	12	6	28	10	12	14	6	11	18	24	24	22	24	23	35	30	32	30	24	NT	NR
Lac18	11/07/2011	C	CRS	NR	18	20	29	14	30	30	28	30	7	30	34	29	24	24	24	22	35	32	34	36	28	NT	NR
Lac19	11/07/2011	C	CRS	NR	16	18	29	12	30	30	28	30	6	30	35	26	24	23	22	23	34	32	35	32	28	NT	NR
Lac20	11/07/2011	C	CRS	NR	19	12	26	20	30	30	24	32	24	28	25	18	24	20	22	20	26	22	23	26	20	NT	NR
Lac21	11/07/2011	C	CRS	NR	11	28	32	16	40	38	30	35	10	32	40	32	32	26	30	30	40	38	36	36	27	NT	NR
Lac22	11/07/2011	C	CRS	<i>Citrobacter freundii</i>	10	14	23	6	36	30	25	30	6	28	34	26	17	18	24	22	22	18	19	19	6	NT	<i>qnrB</i>
Lac23	11/07/2011	C	CRS	NR	12	22	28	12	32	32	26	30	6	28	34	26	26	22	24	24	26	26	NT	24	23	NT	NR
Lac24	11/07/2011	C	CRS	NR	22	6	28	24	36	36	28	34	22	32	36	30	30	20	24	24	30	30	28	28	22	NT	NR
Lac25	11/07/2011	C	CRS	NR	28	22	30	6	34	36	30	36	26	36	40	32	36	22	NT	24	30	NT	NT	28	22	NT	NR
Lac26	11/07/2011	C	CRS	NR	30	18	32	27	36	36	30	36	30	36	40	32	36	18	24	22	34	NT	NT	30	30	NT	NR
Lac27	11/07/2011	C	CRS	NR	23	19	30	27	36	36	28	35	26	32	40	30	30	20	24	23	30	28	NT	28	22	NT	NR
Lac28	11/07/2011	C	CRS	NR	22	18	24	22	29	NT	24	29	20	26	NT	30	30	22	24	24	30	NT	NT	30	24	NT	NR
Lac29	11/07/2011	C	CRS	NR	28	24	30	26	34	36	29	35	12	32	36	30	35	22	25	24	34	NT	NT	30	26	NT	NR
Lac30	11/07/2011	C	CRS	NR	26	18	28	24	34	34	26	32	26	30	34	28	30	20	24	22	30	23	NT	28	20	NT	NR
Lac31	11/07/2011	C	CRS	NR	18	13	26	16	30	NT	26	30	8	28	NT	30	30	18	11	20	30	30	NT	30	24	NT	NR
Lac32	11/07/2011	C	CRS	NR	16	20	28	12	34	32	28	30	12	30	32	29	32	20	20	22	30	32	NT	32	24	NT	NR
Lac33	11/07/2011	C	CRB	NR	28	24	30	28	36	36	30	36	30	34	36	32	36	22	24	22	30	NT	NT	30	28	NT	NR
Lac34	11/07/2011	C	CRB	<i>Citrobacter freundii</i>	10	19	30	11	36	34	28	30	6	6	36	30	16	22	24	23	36	NT	NT	30	24	NT	NR
Lac35	11/07/2011	C	CRB	NR	12	24	30	12	34	34	30	30	8	28	34	28	28	20	24	23	30	30	NT	28	24	NT	NR
Lac36	11/07/2011	C	CRB	NR	14	18	26	13	30	NT	25	28	6	25	NT	30	26	18	NT	24	22	NT	NT	18	22	NT	Negativo <i>qnr</i>
Lac37	11/07/2011	C	CRB	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	6	6	22	6	30	13	11	14	6	15	14	20	24	18	23	24	35	30	30	30	24	NT	NR
Lac38	11/07/2011	C	CRB	NR	23	6	24	20	29	NT	26	30	22	28	NT	30	30	18	20	23	26	NT	NT	28	20	NT	NR
Lac39	11/07/2011	C	CRB	NR	28	18	30	26	36	35	28	34	28	34	36	28	32	23	24	24	32	32	NT	30	28	NT	NR
Lac40	11/07/2011	C	CRB	NR	24	20	28	24	36	36	30	36	28	30	36	30	34	20	24	22	30	30	26	28	22	NT	NR
Lac41	11/07/2011	C	CRB	NR	24	18	26	18	32	NT	30	32	29	20	NT	30	28	22	24	24	32	NT	NT	30	24	NT	NR
Lac42	11/07/2011	C	CRB	NR	11	24	30	10	36	34	30	31	6	30	35	29	29	22	22	24	32	35	NT	34	27	NT	NR
Lac43	11/07/2011	C	CRB	<i>Enterobacter cloacae</i>	8	18	24	9	32	30	24	25	8	12	32	26	28	20	25	21	32	31	NT	31	24	NT	NR
Lac44	11/07/2011	C	CRB	NR	11	24	28	11	30	NT	26	32	6	30	35	27	28	18	24	22	30	NT	NT	30	22	NT	NR
Lac45	11/07/2011	C	CRB	NR	6	NT	28	13	33	30	26	28	14	26	31	27	28	18	20	21	28	24	NT	24	24	NT	NR
Lac46	11/07/2011	C	CRB	NR	17	19	30	12	34	NT	30	30	18	32	30	28	22	24	24	36	NT	NT	34	28	NT	NR	
Lac47	23/08/2011	D	CRF	NR	14	6	26	27	33	34	NT	NT	30	36	20	21	20	NT	20	26	26	26	26	23	6	NT	Negativo <i>qnr</i>
Lac48	23/08/2011	D	CRF	NR	8	12	27	6	30	30	NT	30	6	29	32	28	22	20	NT	20	32	30	30	30	22	NT	NR
Lac49	23/08/2011	D	CRF	NR	22	20	26	17	32	31	NT	30	24	28	30	32	28	20	NT	20	22	20	19	22	7	NT	Negativo <i>qnr</i>

Isolado	Data do Isolamento	Local	Fonte de Isolamento	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																	Diversidade genética						
					AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	EIP	IPM	CN	TOB	AK	LEV		ENO	OFX	MXF ^a	NA	CIP	
					R ≤ 13	R ≤ 11	R ≤ 17	R ≤ 14	R ≤ 14	R ≤ 22	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 14	R ≤ 17	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 12	R ≤ 12	R ≤ 14	R ≤ 13	R ≤ 15		R ≤ 12	R ≤ 16	R ≤ 13	R ≤ 15		
					S ≥ 18	S ≥ 15	S ≥ 21	S ≥ 18	S ≥ 18	S ≥ 26	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 18	S ≥ 21	S ≥ 21	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 15	S ≥ 15	S ≥ 17	S ≥ 17		S ≥ 21	S ≥ 16	S ≥ 20	S ≥ 19	S ≥ 21	
Lac50	23/08/2011	D	CRF	NR	27	24	33	26	33	36	NT	36	24	32	38	30	26	20	NT	20	36	29	32	29	20	NT	NR	
Lac51	23/08/2011	D	CRF	NR	26	25	32	24	32	36	NT	36	24	31	37	30	24	20	NT	NT	34	29	30	26	20	NT	NR	
Lac52	23/08/2011	D	CRF	NR	20	18	29	17	32	33	NT	32	23	30	34	30	28	22	NT	20	35	32	30	34	24	NT	NR	
Lac53	23/08/2011	D	CRF	NR	24	23	29	26	34	34	NT	31	29	30	34	32	31	22	NT	23	32	30	30	26	24	NT	NR	
Lac54	23/08/2011	D	CRF	NR	20	17	25	16	32	32	NT	30	28	28	30	34	30	22	NT	23	22	20	18	20	6	NT	Negativo qnr	
Lac55	23/08/2011	D	CRF	<i>Escherichia coli</i>	14	12	23	6	18	16	NT	14	25	24	22	29	26	20	NT	20	22	16	18	16	10	NT	qnrB19 / bla _{TEM-1}	
Lac56	23/08/2011	D	CRF	NR	14	7	26	18	30	32	NT	36	24	28	34	19	18	18	NT	20	24	22	23	20	6	NT	Negativo qnr	
Lac57	23/08/2011	D	CRF	NR	17	11	29	12	36	38	NT	38	30	34	37	26	22	21	NT	21	36	34	34	30	34	NT	NR	
Lac58	23/08/2011	D	CRF	NR	18	9	30	28	34	36	NT	40	34	31	38	28	32	19	NT	21	26	25	24	22	6	NT	Negativo qnr	
Lac59	23/08/2011	D	CRF	NR	18	25	30	16	36	34	NT	33	10	31	34	34	28	22	NT	22	32	30	30	30	24	NT	NR	
Lac60	23/08/2011	D	CRF	<i>Escherichia coli</i>	18	10	28	6	15	10	NT	10	28	24	16	30	30	22	NT	22	20	14	17	17	6	NT	bla _{CTX-M-2} / oqxAB / Negativo qnr	
Lac61	23/08/2011	D	CRF	<i>Escherichia coli</i>	17	10	26	6	15	10	NT	9	28	24	17	28	30	23	NT	22	18	14	16	16	6	NT	Negativo qnr	
Lac62	23/08/2011	D	CRF	NR	28	28	33	26	36	40	NT	40	27	36	40	32	26	21	NT	21	36	32	36	30	21	NT	NR	
Lac63	23/08/2011	D	CRF	NR	28	28	34	24	34	38	NT	38	26	34	38	34	26	20	NT	22	36	30	34	30	22	NT	NR	
Lac64	23/08/2011	D	CRF	NR	23	20	29	20	35	35	NT	34	30	31	34	35	30	21	NT	22	34	30	31	30	22	NT	NR	
Lac65	23/08/2011	D	CRF	NR	22	20	28	20	34	35	NT	34	29	30	34	35	30	22	NT	22	32	30	30	29	20	NT	NR	
Lac66	23/08/2011	D	CRF	NR	32	31	40	24	38	38	NT	41	24	38	43	32	29	21	NT	22	34	30	30	30	22	NT	NR	
Lac67	23/08/2011	D	CRF	NR	26	24	34	20	32	36	NT	40	24	34	40	34	24	20	NT	20	35	32	36	36	23	NT	NR	
Lac68	23/08/2011	D	CRF	NR	18	16	26	17	34	34	NT	32	26	30	32	34	30	22	NT	20	30	29	30	29	22	NT	NR	
Lac69	23/08/2011	D	CRF	NR	19	15	29	14	36	36	NT	34	24	30	35	32	30	22	NT	23	33	32	31	30	24	NT	NR	
Lac70	23/08/2011	D	CRF	NR	29	28	35	24	35	38	NT	38	26	36	42	32	26	20	NT	20	36	30	35	30	24	NT	NR	
Lac71	23/08/2011	D	CRF	NR	28	26	35	22	36	38	NT	38	25	36	40	34	28	21	NT	21	36	30	34	30	22	NT	NR	
Lac72	23/08/2011	D	CRF	NR	20	19	30	16	33	33	NT	32	23	31	34	30	30	22	NT	22	36	34	30	34	28	NT	NR	
Lac73	23/08/2011	D	CRF	NR	20	22	28	14	30	32	NT	30	22	25	30	30	30	21	NT	20	32	32	32	34	23	NT	NR	
Lac74	23/08/2011	D	CRF	NR	22	22	28	21	34	33	NT	33	27	28	33	34	30	20	NT	21	32	30	31	30	21	NT	NR	
Lac75	23/08/2011	D	CRF	NR	21	20	26	18	32	32	NT	32	28	30	32	32	29	22	NT	21	30	28	30	27	19	NT	NR	
Lac76	23/08/2011	D	CRF	NR	28	26	34	22	36	38	NT	39	25	34	40	31	24	20	NT	20	26	30	36	33	20	NT	NR	
Lac77	23/08/2011	D	CRF	NR	24	24	30	23	31	32	NT	32	18	30	36	30	18	17	NT	17	32	30	30	27	24	NT	NR	
Lac78	23/08/2011	D	CRF	NR	19	16	28	17	32	33	NT	30	24	28	30	34	30	23	NT	23	30	29	29	30	20	NT	NR	
Lac79	23/08/2011	D	CRF	NR	22	19	29	20	34	35	NT	32	29	30	32	32	30	22	NT	22	34	29	30	29	20	NT	NR	
Lac80	23/08/2011	D	CRF	NR	23	22	22	20	32	33	NT	30	29	29	30	31	29	20	NT	20	30	30	30	29	22	NT	NR	
Lac81	23/08/2011	D	CRF	NR	23	22	28	21	35	35	NT	34	29	30	34	36	30	22	NT	23	35	32	32	31	24	NT	NR	
Lac82	23/08/2011	D	CRF	NR	18	13	26	14	32	32	NT	32	22	30	34	35	31	11	NT	22	8	6	6	6	6	NT	Negativo quinolonas	
Lac83	23/08/2011	D	CRF	NR	18	16	30	18	36	36	NT	35	29	32	36	36	34	22	NT	22	34	34	34	30	24	NT	NR	
Lac84	23/08/2011	D	CRF	NR	18	14	29	17	36	34	NT	34	26	30	35	36	30	21	NT	22	31	30	30	29	24	NT	NR	
Lac85	23/08/2011	D	CRF	NR	18	14	26	16	34	32	NT	32	28	30	34	34	30	21	NT	20	32	30	30	30	24	NT	NR	
Lac86	20/03/2012	E	CRS	<i>Citrobacter freundii</i>	17	22	24	14	30	26	24	30	8	27	30	28	26	18	20	10	16	18	13	15	6	0,5	Negativo qnr	
Lac87	20/03/2012	E	CRS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	17	24	20	28	24	22	30	24	26	30	30	26	10	18	18	18	17	14	17	19		qnrB2 / oqxAB / bla _{SHV-1}	
Lac88	20/03/2012	E	CRS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	18	24	19	26	24	18	29	22	25	28	28	30	18	18	18	25	28	25	22	23	28		bla _{SHV-1} / oqxAB
Lac89	20/03/2012	E	CRS	NR	24	16	24	24	30	30	24	26	24	27	28	31	31	20	21	20	24	26	26	24	24	29	NR	

Isolado	Data do Isolamento	Local	Fonte de Isolamento	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*																	Diversidade genética					
					AMC	SAM	TZP	KF	FEP	CTX	EFT	CRO	FOX	CAZ	ATM	ETP	IPM	CN	TOB	AK	LEV		ENO	OFX	MXF ^a	NA	CIP
					R ≤ 13	R ≤ 11	R ≤ 17	R ≤ 14	R ≤ 14	R ≤ 22	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 14	R ≤ 17	R ≤ 19	R ≤ 19	R ≤ 12	R ≤ 12	R ≤ 14	R ≤ 13	R ≤ 15		R ≤ 12	R ≤ 16	R ≤ 13	R ≤ 15	R ≤ 13
					S ≥ 18	S ≥ 15	S ≥ 21	S ≥ 18	S ≥ 18	S ≥ 26	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 18	S ≥ 21	S ≥ 21	S ≥ 23	S ≥ 23	S ≥ 15	S ≥ 15	S ≥ 17	S ≥ 17		S ≥ 21	S ≥ 16	S ≥ 20	S ≥ 19	S ≥ 21
Lac90	20/03/2012	E	CRS	NR	18	15	25	14	26	29	24	26	6	26	28	30	25	20	24	21	30	30	27	24	22	0,015*	NR
Lac91	20/03/2012	E	CRS	NR	10	22	24	6	30	27	24	27	6	26	28	26	24	16	18	17	24	26	22	19	19	0,008*	Negativo qnr
Lac92	20/03/2012	E	CRS	NR	24	19	26	20	26	28	29	30	24	30	30	28	26	18	18	18	24	24	24	24	22	0,015*	NR
Lac93	20/03/2012	E	CRS	NR	24	18	24	21	30	30	24	30	24	29	30	28	30	16	18	18	26	26	26	24	22	0,03*	NR
Lac94	20/03/2012	E	CRS	<i>Escherichia coli</i>	21	19	30	20	30	30	28	30	25	22	32	31	30	19	20	20	12	10	10	6	6	4*	Negativo qnr
Lac95	20/03/2012	E	CRS	<i>Escherichia coli</i>	20	18	30	20	34	32	26	32	26	30	12	30	32	18	19	19	12	8	9	9	6	4*	Negativo qnr
Lac96	20/03/2012	E	CRS	<i>Citrobacter braakii</i>	10	20	28	12	36	32	26	34	7	28	34	30	30	17	17	18	20	20	22	18	11	0,25*	qnrB19
Lac97	20/03/2012	E	CRS	<i>Escherichia coli</i>	19	16	28	16	27	30	26	32	26	30	34	32	30	20	20	21	14	10	11	11	6	4*	Negativo qnr
Lac98	20/03/2012	E	CRS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19	16	18	18	24	24	22	29	20	24	26	24	26	18	21	18	25	26	21	24	24	26	<i>bla</i> _{SHV-11} / <i>oqxAB</i> / Negativo qnrB
Lac99	20/03/2012	E	CRS	<i>Escherichia coli</i>	16	13	24	13	24	26	22	26	24	24	26	30	26	18	18	18	7	6	8	6	6	12	<i>oqxAB</i> / Negativo qnr
Lac100	20/03/2012	E	CRS	<i>Escherichia coli</i>	20	18	26	18	30	30	24	30	26	28	30	32	30	14	20	19	8	6	7	7	6	7	<i>oqxAB</i> / Negativo qnr
Lac101	20/03/2012	E	CRS	NR	14	19	21	8	26	23	18	19	7	23	29	22	20	18	20	20	24	27	23	22	23	28	Negativo ESBL
Lac102	20/03/2012	E	CRS	NR	20	20	30	6	30	30	28	30	19	20	35	29	22	19	20	20	24	22	24	18	14	28	Negativo qnr
Lac103	20/03/2012	E	CRS	NR	22	24	29	18	30	30	30	34	22	30	34	32	24	19	16	18	19	28	30	31	24	36	NR
Lac104	20/03/2012	E	CRS	NR	6	18	24	6	30	28	24	24	6	26	30	30	22	14	18	18	23	30	24	22	21	30	NR
Lac105	20/03/2012	E	CRS	<i>Escherichia coli</i>	18	18	24	16	30	30	20	28	26	26	30	34	30	19	18	18	12	7	8	8	6	12	<i>oqxAB</i> / Negativo ESBL e qnr
Lac106	20/03/2012	E	CRS	NR	18	18	25	15	29	NT	20	24	24	27	27	30	28	19	21	20	14	10	12	9	6	14	<i>bla</i> _{SHV} / <i>bla</i> _{TEM} / Negativo qnr
Lac108	20/03/2012	E	CRS	NR	17	16	27	6	30	30	26	26	24	30	36	30	24	20	24	22	36	30	30	28	30	34	NR
Lac109	20/03/2012	E	CRS	NR	19	18	30	7	30	32	29	32	24	30	35	30	24	18	24	20	26	22	24	18	20	29	NR
Lac110	20/03/2012	E	CRS	NR	7	18	24	6	24	26	24	24	6	26	20	24	21	18	18	18	19	24	28	24	24	30	NR
Lac111	20/03/2012	E	CRS	NR	12	18	30	6	30	28	30	28	30	19	30	32	31	22	18	22	20	31	30	24	27	32	NR

Isolado	Data do Isolamento	Local	Fonte de Isolamento	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*													Diversidade genética
					AMC	CTX	EFT	FOX	CAZ	CN	AK	CIP	ENO	NA	TE	FOS	C	
					R ≤ 13	R ≤ 22	R ≤ 19	R ≤ 14	R ≤ 17	R ≤ 12	R ≤ 14	R ≤ 15	R ≤ 15	R ≤ 13	R ≤ 11	R ≤ 12	R ≤ 12	
					S ≥ 18	S ≥ 26	S ≥ 23	S ≥ 18	S ≥ 21	S ≥ 15	S ≥ 17	S ≥ 21	S ≥ 21	S ≥ 19	S ≥ 15	S ≥ 16	S ≥ 18	
S226	27/08/2012	F	CRF	NR	23	36	30	20	32	18	16	42	35	29	8	29	NT	Negativo <i>qnr</i>
S227	27/08/2012	F	CRF	NR	24	36	30	24	30	20	20	36	30	24	6	26	NT	NR
S228	27/08/2012	F	CRF	NR	25	35	30	24	32	22	21	36	30	24	6	30	NT	NR
S229	27/08/2012	F	CRF	NR	25	34	29	20	30	22	22	35	30	22	6	34	NT	NR
S230	27/08/2012	F	CRF	NR	25	35	30	24	32	20	20	36	30	26	6	28	NT	NR
S231	27/08/2012	F	CRF	NR	24	32	29	22	29	22	20	34	29	22	6	34	NT	NR
S232	27/08/2012	F	CRF	NR	28	36	32	24	33	21	20	32	22	18	7	24	NT	Negativo <i>qnr</i>
S233	27/08/2012	F	CRF	NR	24	34	29	22	30	22	22	20	10	6	6	12	NT	Negativo <i>qnr</i>
S234	27/08/2012	F	CRF	NR	26	36	32	23	32	22	23	30	18	7	30	NT	Negativo <i>qnr</i>	
S235	27/08/2012	F	CRF	NR	25	34	32	23	30	13	22	36	30	20	6	24	NT	NR
S236	27/08/2012	F	CRF	NR	29	35	32	24	28	12	19	36	30	23	7	24	NT	NR
S237	27/08/2012	F	CRF	NR	24	32	30	23	30	23	22	34	29	23	6	34	NT	NR
S238	27/08/2012	F	CRF	NR	25	35	30	24	32	20	21	36	30	24	6	26	NT	NR
S239	27/08/2012	F	CRF	NR	24	35	30	24	30	20	20	36	30	24	6	26	NT	NR
S240	27/08/2012	F	CRF	NR	25	31	28	22	30	22	21	34	28	22	6	25	22	NR
S241	27/08/2012	F	CRF	NR	25	32	28	22	30	22	22	32	28	20	8	27	20	NR
S242	27/08/2012	F	CRF	NR	26	34	30	24	30	24	24	34	30	24	8	25	22	NR
S243	27/08/2012	F	CRF	NR	26	32	30	22	30	22	22	36	30	24	7	28	22	NR
S244	27/08/2012	F	CRF	NR	28	32	30	24	30	14	22	32	32	22	9	30	19	NR
S245	27/08/2012	F	CRF	NR	28	38	34	24	32	21	22	30	21	22	8	26	20	NR
S246	27/08/2012	F	CRF	NR	26	32	30	24	30	13	21	36	30	16	7	26	18	NR
S247	27/08/2012	F	CRF	NR	27	32	30	23	30	13	22	40	30	25	7	26	20	NR
S248	27/08/2012	F	CRF	NR	25	32	28	22	30	22	22	18	9	6	7	14	NT	Negativo <i>qnr</i>
S249	27/08/2012	F	CRF	NR	26	36	32	23	32	20	20	30	19	20	7	30	NT	NR
S250	27/08/2012	F	CRF	NR	24	32	26	20	30	22	20	36	28	20	6	24	NT	NR
S251	27/08/2012	F	CRF	NR	26	35	30	23	32	12	20	18	10	6	7	12	NT	Negativo <i>qnr</i>
S252	27/08/2012	F	CRF	NR	26	35	30	23	32	12	22	18	8	6	6	13	NT	Negativo <i>qnr</i>
S253	27/08/2012	F	CRF	NR	26	32	30	23	28	22	22	15	6	6	7	14	NT	Negativo <i>qnr</i>

Isolado	Data do Isolamento	Fonte de Local Isolamento	Identidade	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)*													Diversidade genética	
				AMC	CTX	EFT	FOX	CAZ	CN	AK	CIP	ENO	NA	TE	FOS	C		
				R ≤ 13	R ≤ 22	R ≤ 19	R ≤ 14	R ≤ 17	R ≤ 12	R ≤ 14	R ≤ 15	R ≤ 15	R ≤ 13	R ≤ 11	R ≤ 12	R ≤ 12		
				S ≥ 18	S ≥ 26	S ≥ 23	S ≥ 18	S ≥ 21	S ≥ 15	S ≥ 17	S ≥ 21	S ≥ 21	S ≥ 19	S ≥ 15	S ≥ 16	S ≥ 18		
S254	27/08/2012	F	CRF	NR	26	35	30	24	24	20	19	14	6	6	6	12	NT	Negativo <i>qnr</i>
S255	27/08/2012	F	CRF	NR	26	30	28	23	30	13	20	36	30	24	8	38	20	NR
S256	27/08/2012	F	CRF	NR	26	32	36	22	30	14	20	36	30	22	8	37	18	NR
Ec56	27/08/2012	F	CRF	<i>Escherichia coli</i>	18	30	24	26	28	20	19	28	19	16	6	10	NT	<i>qnrB19</i>
Ec57	27/08/2012	F	CRF	<i>Escherichia coli</i>	24	32	26	28	30	6	22	30	22	18	6	29	NT	<i>qnrB19 / oqxAB</i>
Ec58	27/08/2012	F	CRF	<i>Escherichia coli</i>	20	30	24	24	26	20	20	24	18	14	6	13	NT	<i>qnrB</i>
Ec59	27/08/2012	F	CRF	NR	20	32	26	23	29	20	16	36	30	24	6	30	NT	NR
Ec60	27/08/2012	F	CRF	NR	7	32	28	24	30	20	24	26	20	7	6	28	NT	NR
Ec61	27/08/2012	F	CRF	<i>Escherichia coli</i>	23	35	26	27	30	6	22	28	22	18	6	30	NT	<i>qnrB / oqxAB</i>
Lac112	27/08/2012	F	CRF	NR	13	19	16	25	25	19	21	31	30	24	6	18	NT	NR
Lac113	27/08/2012	F	CRF	NR	18	36	25	25	30	22	24	36	34	30	29	36	NT	NR
Lac114	27/08/2012	F	CRF	NR	14	28	24	24	28	24	24	32	30	30	22	18	NT	NR
Lac115	27/08/2012	F	CRF	NR	16	30	21	24	28	22	20	30	28	24	6	28	NT	NR
Lac116	27/08/2012	F	CRF	NR	22	30	24	24	26	18	18	28	28	22	22	26	NT	NR
Lac117	27/08/2012	F	CRF	NR	22	30	24	24	28	20	21	34	28	24	8	30	NT	NR
Lac118	27/08/2012	F	CRF	NR	15	28	24	24	26	18	20	30	26	24	6	26	NT	NR
Lac119	27/08/2012	F	CRF	NR	21	30	24	24	26	10	20	30	28	24	6	22	NT	NR
Lac120	27/08/2012	F	CRF	NR	15	30	24	25	27	23	24	30	32	30	22	19	NT	NR
Lac121	27/08/2012	F	CRF	NR	24	34	30	27	30	19	20	24	24	11	6	10	NT	Negativo <i>qnr</i>
Lac122	27/08/2012	F	CRF	NR	14	18	16	24	26	19	20	30	30	24	6	28	NT	NR
Lac123	27/08/2012	F	CRF	NR	20	20	17	13	20	23	22	30	30	22	10	14	NT	NR
Lac124	27/08/2012	F	CRF	NR	16	25	23	23	28	23	24	30	28	28	22	19	NT	NR
Lac125	27/08/2012	F	CRF	NR	21	28	23	24	25	10	19	30	30	22	6	27	NT	NR
Lac126	27/08/2012	F	CRF	NR	13	18	17	25	24	20	21	30	30	25	6	30	NT	NR
Lac127	27/08/2012	F	CRF	NR	22	31	25	24	28	10	21	36	30	24	6	30	NT	NR
Lac128	27/08/2012	F	CRF	NR	21	27	21	24	25	16	18	24	18	9	7	24	NT	Negativo <i>qnr</i>
Lac129	27/08/2012	F	CRF	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22	30	24	24	26	9	20	18	14	13	7	18	NT	<i>qnrB19 / oqxAB</i>
Lac130	27/08/2012	F	CRF	NR	26	34	30	27	30	22	22	30	26	7	6	31	NT	Negativo <i>qnr</i>

* De acordo com CLSI (2008; 2011).

Local: estabelecimento comercial onde foi obtida a amostra de carne.

AK: amicacina; **AMC:** amoxicilina/ácido clavulânico; **ATM:** aztreonam; **C:** cloranfenicol; **CAZ:** ceftazidima; **CIP:** ciprofloxacina; **CN:** gentamicina; **CRO:** ceftriaxona; **CTX:** cefotaxima; **EFT:** ceftiofur; **ENO:** enrofloxacina; **ETP:** ertapenem; **FEP:** cefepima; **FOS:** fosfomicina; **FOX:** cefoxitina; **IPM:** imipenem; **KF:** cefalotina; **LEV:** levofloxacina; **MXF:** moxifloxacina; **NA:** ácido nalidíxico; **OFX:** ofloxacina; **SAM:** ampicilina/sulbactam; **TE:** tetraciclina; **TOB:** tobramicina; **TZP:** piperacilina/tazobactam.

NR: teste não realizado ou inconclusivo. **NT:** antibiótico não testado. “Mesma cepa”: cepas com o mesmo perfil de ERIC-PCR.

R: tamanho do halo que indica resistência ao antimicrobiano (números marcados em **vermelho**); S: tamanho do halo que indica sensibilidade ao antimicrobiano (números marcados em **preto**); valores intermediários a R e S indicam resistência intermediária ao antimicrobiano (números marcados em **verde**).