



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS
Instituto de Ciências Biomédicas – IB
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular –
PPGBMC

**"Avaliação da presença das Carbapenemases em *Salmonella* e
Escherichia coli isoladas de fontes animal, ambiental e humana
no período de 2014 a 2017."**

Márcia Lima Festivo Vieira

Orientadora: Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues

Rio de Janeiro

2019

Márcia Lima Festivo Vieira

"Avaliação da presença das Carbapenemases em *Salmonella* e *Escherichia coli* isoladas de fontes animal, ambiental e humana no período de 2014 a 2017."

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular

Orientadora: Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues

Rio de Janeiro

2019

V657i Vieira, Marcia Lima Festivo

Avaliação da presença das Carbapenemases em *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de fontes animal, ambiental e humana no período de 2014 a 2017. / Marcia Lima Festivo Vieira. -- Rio de Janeiro, 2019.
75f:il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2019.

1. Carbapenêmicos. 2. *E. coli*. 3. *Salmonella*. 4. Resistência bacteriana. I. Rodrigues, Dália dos Prazeres, orient. II. Título.

"Avaliação da presença das Carbapenemases em *Salmonella* e *Escherichia coli* isoladas de fontes animal, ambiental e humana no período de 2014 a 2017."

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular

Banca Examinadora:

Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque (Doutor em Ciências) - UNIRIO.

Dra. Verônica Dias Gonçalves (Doutora em Microbiologia Médica e Humana) - IOC/FIOCRUZ.

Dr. Pablo Trindade (Doutor em Ciências) - UNIRIO.

Dra. Renata Garcia Costa (Doutora em Ciências) - IOC/FIOCRUZ.

“E não vai demorar que passemos adiante (...) o alto escopo de uma grande ciência, de uma grande e bela ciência, que se faz arte na defesa da vida.”

Chagas, 1928

AGRADECIMENTOS

“Quero agradecer em primeiro lugar a DEUS que esteve ao meu lado o tempo inteiro e que coloca as coisas em nossas mãos na hora certa.

Agradecer a minha família pela compreensão e o apoio neste caminho percorrido e em especial a minha filha Gabriella esta sim é e sempre será minha incentivadora e inspiradora para sempre ir em frente. Quero agradecer a equipe inteira do Laboratório de Enterobactérias-IOC-FIOCRUZ, aqueles que estão aqui ou mesmo os que já passaram por aqui, de todo coração a ajuda prestada neste caminho percorrido.

Com muito carinho, quero agradecer aqueles que me ajudaram bastante: Laura, Marcelle, Emily, Veronica, Luísa, Maiara, Gabi, Viviane, Gisele, André, Elisabeth, Bruno, Renata, Sr. Elso e meu amado e querido Sr. Evaldo (sei que ele torceu por mim), e também ao setor de Meio de cultura que tanto me ajudou na confecção dos meios de cultura e a todos que gostam de mim e sempre me ajudaram muito. E até aqueles que não me lembro, mas que fez parte em algum momento nesta caminhada.

Em especial, a minha grande e incansável chefe, orientadora e ainda mais uma amiga que sempre acreditou e torceu por mim. Agradecer pela a ajuda e “broncas” na hora certa.

Ao pessoal da UNIRIO, a Universidade que me deu a chance de crescer na minha carreira e me ensinou muito, principalmente aos professores que me ajudaram neste caminho do Mestrado.

Agradecer aos amigos em especial, Renata, que me ajuda em qualquer hora e lugar quando peço, sempre com a mão amiga que está estendida para mim.

Agradecer as pessoas que não citei, mas de alguma maneira estão sempre comigo.

Obrigado á todos de coração”

Resumo

Avaliação da presença das Carbapenemases em *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de fontes animal, ambiental e humana no período de 2014 a 2017.

A introdução e dispersão de espécies bem como de suas características genéticas em um ambiente pode ocorrer de maneira natural ou resultante da atividade humana. O objetivo deste estudo foi investigar fenotipicamente a resistência antimicrobiana incluindo o mecanismo de produção de carbapenemases, em cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp, isoladas de fontes humana, animal e ambiental no período de 2014 a 2017, visando reconhecer a dispersão ambiental de microrganismos portadores destas características em nosso meio. Foram avaliadas 120 cepas, sendo 40 de *E. coli* e 80 *Salmonella* spp., as quais foram submetidas à identificação bioquímica, determinação da concentração inibitória mínima para avaliação de seu perfil de resistência. Os genes *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}* e *mcr-1* foram avaliados por reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados apontaram entre as 40 cepas de *E. coli*, 30% de resistência ao Imipenem, 35% ao Meropenem e 10% para Ertapenem. A avaliação através da PCR mostrou que 22,5% das cepas apresentaram *bla_{IMP}*, 7,5% *bla_{KPC}*, 5% *bla_{OXA-48}* e entre as 37,5% das cepas com resistência a Colistina, apenas 2,5% apresentando o gene *mcr-1*. Em relação a *Salmonella*, entre as 80 cepas, foi observado que 82,5% apresentaram resistência ao Imipenem, 5% ao Meropenem e 2,5% para Ertapenem, (CIM). Com relação a presença dos genes, somente foi detectada uma cepa positiva para *bla_{IMP}*, 48 para *bla_{VIM}* e 4 *bla_{OXA-48}*. O gene *bla_{NDM}* não foi encontrado em nenhuma das 120 cepas avaliadas. Entre os genes a prevalência observada foi do gene *bla_{IMP}*, seguido pelo *bla_{KPC}* e *bla_{OXA-48}* em *E. coli* e *bla_{VIM}* seguido do *bla_{OXA-4}* em *Salmonella* spp, Com a dispersão desses micro-organismos em nosso meio e os impactos que podem refletir no ambiente em curto, medio ou longo prazo, os resultados refletem a necessidade de uma vigilância contínua para a adoção de possíveis ações de controle.

Palavras chaves: Carbapenêmicos, *E. coli*, *Salmonella*, Resistência bacteriana.

Abstract

Evaluation of the Carbapenemases presence in *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from human, animal, environmental sources in 2014 to 2017.

The introduction and dispersion of species as well as their genetic characteristics in an environment are natural phenomenon or result of human activity. The aim of this study was to investigate by phenotypic and genotypic methods in strains *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. isolated from human, animal and environmental sources from 2014 to 2017 the antimicrobial resistance characteristics including the mechanisms of production of carbapenemases. The total of 120 strains, including 40 *E. coli* and 80 *Salmonella* spp., were submitted to biochemical identification, determination of the minimum inhibitory concentration to evaluate their resistance profile and the presence of different genes. The blaKPC, blaIMP, blaVIM, blaNDM, bla OXA-48 and mcr-1 genes were evaluated by polymerase chain reaction (PCR). The results showed, among the 40 strains of *E. coli*, 30% resistance to imipenem, 35% to meropenem and 10% to ertapenem. The PCR evaluation showed that 22.5% of the strains had blaIMP, 7.5% blaKPC, 5% blaOXA-48 and among the 37.5% of strains resistant to colistin, only 2.5% had the mcr-1 gene. Regarding *Salmonella*, there were 80 strains, with 82.5% resistance to imipenem, 5% for meropenem and 2.5% for Ertapenem, (MIC). Regarding the presence of genes, blaIMP was detected only in one strain, 48 for blaVIM and 4 blaOXA-48. The blaNDM gene was not found in the total of 120 strains evaluated. Among the genes, the prevalence was blaIMP gene, followed by blaKPC and blaOXA-48 in *E. coli* and blaVIM followed by blaOXA-48 in *Salmonella* spp. The results reflect the need for continuous surveillance for the adoption of possible control actions.

Keywords: Carbapenems, *E. coli*, *Salmonella*, Bacterial resistance.

SUMÁRIO

1 - Introdução	1
2- Revisão de Literatura	4
• Gênero <i>Escherichia coli</i>	4
• Gênero <i>Salmonella</i>	6
• Mecanismos de Resistência antimicrobiana..	10
3 - Justificativa	14
4 – Objetivos	15
5 – Material e Métodos	15
5. 1 – Amostragem do Estudo	15
5. 2 - Recuperação de Cepas	15
5. 3 - Confirmação do Perfil Bioquímico	16
5. 4 - Diagnóstico Conclusivo Sorológico	16
5. 5 – Manutenções das Cepas	16
6 – Confirmação e Determinação do Perfil de Suscetibilidade aos antimicrobianos	16
6. 1 – Teste de Difusão em discos (TSA)	17
6. 2 – Preparo do inóculo	17
6. 3 – Antimicrobianos Avaliados	17
6. 4 – Procedimento da Técnica	17
6. 5 – Leitura e Interpretação	18

7 – Concentração Mínima Inibitória..	19
7.1 – Preparo do Inóculo	19
7.2–Execução da Técnica de Macrodiluição	19
7. 3 – Interpretação e divulgação dos resultados	20
7. 4 – Cepas Padrões	20
8 - Detecção molecular de genes <i>bla</i> por meio da reação de cadeia em polimerase	21
8. 1 – Amostragem de cepas	21
8.2– Extração e purificação de DNA Plasmidial	22
8.3 – Técnica de Amplificação	23
9. Resultados	25
9.1 – <i>E. coli</i>	26
9.2 - <i>Salmonella</i>	32
10 - Discussão	41
11 – Conclusão	50
12– Referências Bibliográficas	52

LISTA DE QUADROS:

- Quadro 1:** Distribuição quantitativa dos sorovares de *Salmonella*, de acordo com as espécies e subespécies.07
- Quadro 2:** Critérios interpretativos as zonas de inibição do diâmetro avaliado em milímetros dos antibióticos utilizados, de acordo com o CLSI.19
- Quadro 3:** Solvente e diluente utilizado no preparo da solução antimicrobiana, de acordo com o CLSI 2019 (de uso humano e veterinário).20
- Quadro 4(a e b):** Sequência de Nucleotídeos empregados na caracterização de genes de resistência em *Salmonella* spp. e *E. coli*. 24 e 25
- Quadro 5:** Quantitativo de *E. coli* caracterizada no LRNEB distribuídos de acordo com a fonte de isolamento e Estados brasileiros.....26
- Quadro 6:** Distribuição de sorovares de *Salmonella* spp. identificadas pelo LRNEB, de acordo com a fonte de isolamento e Estados brasileiros. 33

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Fórmula química do Anel β -lactâmicos.	11
Figura 2: Fórmula química dos antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos.	12
Figura 3: Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos em enterobactérias	14
Figura 4: Representação gráfica da Técnica de PCR.	22
Figura 5: Representação gráfica da Técnica de PCR.....	23
Figura 6: Produto da amplificação dos genes do <i>mcr-1</i> da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em <i>E.coli</i> , (Colistina).	29
Figura 7: Produto da amplificação dos genes de resistência para Carbapenems obtidos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em <i>E.coli</i>	30
Figura 8: Produto da amplificação dos genes de resistência para Carbapenems obtidos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em <i>E. coli</i>	30
Figura 9: Esquema de cepas para os genes que se apresentaram para <i>E. coli</i>	32
Figura 10: Produto da amplificação dos genes de resistência para Carbapenems obtidos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em <i>Salmonella spp.</i>	37
Figura 11: Produto da amplificação dos genes de resistência para Carbapenems obtidos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em <i>Salmonella spp.</i>	38
Figura 12: Esquema de amplificação de genes de <i>Salmonella</i> e seus percentuais	41

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Padrão de Interpretação do Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos, CLSI humano e veterinário (atualizado anualmente).....18

Tabela 2: Perfis de Susceptibilidade de *E. coli*, com fonte de isolamento, o Estado e Genes, do período de 2014 a 2017.27

Tabela 3: Perfil feno/genotípico de suscetibilidade aos antimicrobianos detectadas em *Salmonella* spp.....34 e 35.

Tabela 4: Resumo do gráfico e seus valores correspondentes.....39

LISTA DE GRÁFICOS:

- Gráfico 1:** Avaliação percentual do Perfil de Susceptibilidade de *E. coli* aos Carbapenêmicos28
- Gráfico 2:** Percentual de genes de resistência detectados em *E. coli*.....31
- Gráfico 3:** Distribuição percentual dos sorovares de *Salmonella* de acordo com os anos de estudo.....36
- Gráfico 4:** Avaliação em porcentual do Perfil de suscetibilidade aos Carbapenems por MIC, detectados em *Salmonella* spp. caracterizado no período de 2014 a 2017.....37
- Gráfico 5:** Percentual de genes de resistência aos carbapenems detectados em *Salmonella*, distribuídas de acordo com o ano.....39
- Gráfico 6:** Percentual geral de genes de resistência aos carbapenems detectados em *Salmonella* spp.....40

LISTA DE ABREVIATURAS:

AMP: ampicilina
AmpC: AmpC β -lactamases
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC: American Type Culture Collection
CAZ: ceftazidima
CDC: Centers for Disease Control and Prevention
CIM: Concentrações Inibitórias Mínimas
CHL: cloranfenicol
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
CIP: ciprofloxacina
CPE: carbapenemase-producing Enterobacteriaceae
CRE: carbapenem-resistant Enterobacteriaceae
COL: colistina
DNA: deoxyribonucleic acid
DTA: Doenças transmitidas por alimentos
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ERC - Enterobactérias resistentes aos carbapenens
ERT: ertapenem
ESBL - Extended-Spectrum β -Lactamases
E.C: Escherichia coli
E-test: epsilometer test
Fiocruz: Fundação Oswaldo Cruz
FOX: cefoxitina
IMP: Imipenem
imp: Imipenemase
IOC: Instituto Oswaldo Cruz
ITU: Infecções do trato urinário
GEN: gentamicina
KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
LRNEB: Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas
LABENT: Laboratório de Enterobactérias

LACEN: Laboratório de Saúde Pública
MBL: metallo- β -lactamase
MEM: meropenem
MURNAC: Ácido N-acetilmurâmico
NAL: ácido nalidixico
ndm: New Delhi metallo- β -lactamase
NIT: nitrofurantoina
oxa-48: oxacillinas
PBPs: proteínas fixadores de penicilinas
PCR: Polymerase Chain Reaction
RNA: ribonucleic acid
ST: Sequence type
S: *Salmonella*
STR:estreptomicina
TCY: tetraciclina
UTI: Unidade de Terapia Intensiva
vim: Verona integron–encoded metallo- β lactamase

1. INTRODUÇÃO:

O ambiente onde as pessoas residem e/ou trabalham tem grande influência sobre sua saúde e bem estar. Antigamente era considerado que existiam doenças típicas e ocorrentes em países desenvolvidos e outros grupos de doenças as quais eram relacionadas a carência de saneamento e qualidade da água. Atualmente com a dispersão ambiental, a introdução de espécies de patógenos pode ocorrer de forma natural, porém, na maioria dos casos, tem forte correlação com a espécie humana e, em especial, com a expansão e globalização.

Considerando tais aspectos e tendo em vista a realização de eventos ocorridos no Brasil, os quais positivamente resultaram na chegada e mobilização de uma população numericamente elevada e variada, a dispersão ambiental de seus resíduos em nosso sistema de esgotamento sanitário resulta um questionamento sobre o perfil microbiano constantemente eliminado.

O Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LRNEB) recebe cepas de todo território nacional e que atua no monitoramento da resistência antimicrobiano. No presente estudo/trabalho foram selecionadas como modelos *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., avaliadas no período de 2014 a 2017 e que apresentavam perfil intermediário ou resistente aos carbapenêmicos, visando conhecer seu perfil molecular e a dispersão em nosso meio.

Em meados da década de 1940, muitos antibióticos com ação em diferentes alvos celulares foram descobertos e introduzidos na prática clínica para controle de infecções bacterianas (Walsh, 2003; Noskin, 2005; Gupta, 2009). Os antibióticos são caracterizados conforme seu mecanismo de ação, dentre os quais estão: (1) a interferência na síntese de parede celular, (2) a inibição da síntese de proteína, (3) a interferência na síntese de ácido nucleico e (4) a inibição de vias metabólicas (Tenover,2006). Por outro lado, as bactérias podem dispor de diferentes mecanismos para resistir à ação de agentes antimicrobianos, como a inativação deste por ação de enzimas de degradação ou modificação, alteração de sítios alvo, redução de permeabilidade de membrana e expulsão de compostos por mecanismo de bomba de efluxo. Alguns genes de resistência podem ser constitutivos, tendo origem cromossomal, sendo implicados na proteção dos microrganismos produtores daqueles existentes (Coculesco,2009; Martinez, 2009).

O uso destas drogas em humanos, na criação de animais e atividades veterinárias pode ser capaz de, selecionar cepas eventualmente resistentes, resultando na ocorrência de colonização e infecção, por diversos microrganismos como as enterobactérias, as quais apresentam diferentes perfis de resistência, o que pode interferir na terapêutica (Martínez e Baquero, 2002; Kümmerer e Henninger, 2003; Guenther, 2011). No meio ambiente, a seleção de microrganismos resistentes aos antimicrobianos pode ser resultado da produção destes compostos por microrganismos do solo, bem como decorrente de eliminação de fezes humanas e de animais contendo resíduos de drogas (Kümmerer, 2015; Costanzo et al, 2005; Ajiboye et al, 2009).

Um mecanismo que é reconhecido pela importância na transferência de resistência é a conjugação bacteriana, que permite a transferência de genes codificadores de resistência a múltiplos agentes antimicrobianos (Martinez e Baquero, 2002; Hawkey e Jones, 2009; Vaidya, 2011). A participação de genes, associados à plasmídios, transposons e integrons, contribui para sua disseminação entre bactérias de origem hospitalar e comunitária (Roberts, 2005; Giedraitienė et al 2011). Um grande complicador se refere ao enorme potencial de aquisição e montagem dos blocos de genes e a transferência horizontal por elementos genéticos especializados (Mayer, 1988; Leavitt et al, 2010; Vaidya, 2011). Outros mecanismos que podem estar envolvidos na transferência de elementos genéticos entre células bacterianas são a transdução e transformação (Giedraitienė et al, 2011).

Desde o surgimento das penicilinas, vários outros compostos, semi-sintéticos e sintéticos derivados das penicilinas, têm sido desenvolvidos, entre eles, os beta-lactâmicos que representam uma das classes de antimicrobianos amplamente usada em humanos e animais. Atuam na parede celular bacteriana, inibindo a sua síntese ao se ligarem em proteínas específicas (proteínas fixadoras de penicilinas - PBPs). Assim tem a colistina, que é o antibiótico da família das polimixinas. Esta foi descontinuada como um tratamento para infecções bacterianas na década de 1970, por apresentar efeitos tóxicos tendo em vista que atua na membrana celular. Portanto, é alarmante que a prevalência de resistência à colistina tenha se tornado uma preocupação significativa, após a identificação da resistência à colistina é mediada pelo plasmídeo, ou por mutação na amostra.

O principal mecanismo de resistência dos microrganismos beta-lactâmicos é a produção de beta-lactamases, enzimas que hidrolisam o anel beta-lactâmico promovendo a inativação irreversível destes fármacos. (Guenther et al, 2011). Segundo Bush e Fisher (2011), a produção de beta-lactamases está entre os mecanismos mais frequentes que são associados à ocorrência de cepas multirresistentes em Gram-negativos, tanto no ambiente hospitalar quanto no comunitário, devido à associação entre estes e outros genes de resistência para outras classes de antimicrobianos num mesmo elemento genético.

As carbapenemases são beta-lactamases que, além de inativarem a ação de cefalosporinas de amplo espectro e cefamicinas, hidrolisam também carbapenêmicos como imipenem e meropenem. Os carbapenêmicos são considerados uma escolha terapêutica para infecções por enterobactérias resistentes aos beta-lactâmicos e quinolonas, o que favorece a seleção de cepas resistentes (Arnold et al, 2011). Atualmente são conhecidas carbapenemases pertencentes a diferentes classes (classe A, B ou D), sendo algumas codificadas por genes cromossomais e ou plasmidiais. (Queenan; Bush, 2007; Bush e Fisher, 2011). Algumas como: *bla_{KPC}* (do inglês, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases), *bla_{IMP}* (Imipenemase) *bla_{VIM}* (Verona integron–encoded metallo-β-lactamase) *bla_{NDM}* (New Delhi metallo-β-lactamase), *bla_{OXA}* (oxacillin-hydrolyzing), ganham atenção em virtude da dispersão mundial apresentada e de surtos hospitalares ocorridos por microrganismos (Walsh et al., 2005; Queenan; Bush, 2007; Nordmann; et al., 2011; Nordmann; et al., 2012; Munoz-Price et al., 2013).

As infecções por bactérias produtoras de carbapenemases estão associadas a elevadas taxas de morbidade e mortalidade e ocorrem mais frequentemente entre pessoas com internações prolongadas, pacientes crônicos, entre outros. Contudo sua disseminação em nosso meio é desconhecida, fortalecendo aspectos relacionados a vigilância ativa e monitoramento de bactérias resistentes aos carbapenêmicos na cadeia de dispersão.



2. REVISÃO DE LITERATURA

As Enterobactérias caracterizam-se por se apresentarem como: bacilos Gram negativos, fermentadores da glicose, com ou sem produção de gás, oxidase negativas, reduzem nitrato a nitrito e que crescem bem no meio de Mc Conkey ou/e EMB ou mesmo meio seletivo Hecktoen. As bactérias do estudo são *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

Escherichia coli

Escherichia coli é um bacilo Gram negativo anaeróbico facultativo, vive em nosso trato digestivo, compondo o que chamamos de flora intestinal. Esse tipo de microrganismo também pode ser encontrado nos intestinos de animais, como bois, vacas, ovelhas, cães, gatos. No entanto, dependendo da situação do sistema imunológico ou do local em que ela se encontra, pode causar infecções de leves a graves. Algumas chegam a ser fatais. Podem ser móveis por flagelos peritríquios ou imóveis, fermentam a glicose, a lactose, tem ou não a utilização de citrato, descarboxilação da lisina, não produz sulfeto de hidrogênio (H₂S), produção de gás (CO₂), oxidase, produção de indol, produção de uréia, produção de fenilalanina desaminase ou opção triptofenase, como outras provas de identificação como: fermentação de outros carboidratos: sacarose, arabinose, dulcitol, manitol, etc., como utilização de aminoácidos: arginina e ornitina. Algumas cepas não fermentam sorbitol, observados em *E. coli* O157. (Varnan; Evans, 1996). O antígeno “O” identifica o sorogrupo da cepa enquanto que a combinação do antígeno “O” e “H” irá identificar o sorotipo (Meng; Feng; Doyle, 2001). O antígeno “O” é caracterizado por ser uma endotoxina termoestável, liberado durante a fase de multiplicação ou após a morte bacteriana, características antigênicas contribuem para a identificação dos sorogrupos de *E. coli*, o qual é baseado na identificação de antígenos “O”(somático) relacionados a polissacarídeos da membrana externa; antígenos “H” (flagelares), cuja a composição é proteica (flagelina) e antígenos “K” (capsulares), compostas por ácido polimérico com 2% de açúcar reduzidos com polissacarídeos.



Alguns isolados de *E.coli* provenientes de animais e humanos apresentam uma grande diversidade de patótipos, com muitos genes, sugerindo a possibilidade de trocas genéticas aumentando a probabilidade do surgimento de patógenos emergentes (Kuhnert; P. Boerlin; P. Frey; J. 2000). Além disso, muitas bactérias evoluem por transferência horizontal o que facilita sua adaptação. Seres humanos podem ser colonizado e ou infectados por *E. coli* resistente a antimicrobianos oriundos de animais por contato direto, por via alimentar ou através do ambiente.

Outra fonte de relevância é o despejo de material domiciliar, hospitalar e industrial, sem tratamento prévio, em ambientes aquáticos, atuando na seleção de microrganismos resistentes, que contaminam o ambiente, e posteriormente, podem se estabelecer via colonização/infecção em humanos e outros animais, que usarão esta água contaminada para consumo, lazer, atividade profissional, etc. (Kümmerer e Henninger, 2003; Tzoc; Arias, 2004; Cunha et al, 2011). O ambiente marinho, devido à sua salinidade, restaura as condições de equilíbrio do meio, o que não acontece com sistemas fechados como as baías e rios, onde há alterações produzidas por descargas contínuas de esgoto.

Alguns aspectos como a condutividade, concentração de fósforo, pH e temperatura da água fornecem informações sobre a qualidade de um determinado corpo d'água. A condutividade é maior quanto maior for à concentração de sólidos totais dissolvidos, e esta concentração pode estar relacionada a derramamento de esgoto doméstico. O pH é importante para a manutenção da vida aquática e, alterações nos valores normais também podem estar ocorrendo por derramamento de esgoto doméstico e industrial. A temperatura influencia o metabolismo dos organismos do meio aquático, bem como a solubilidade de substâncias (Von Sperling, 1996).



E. coli

***Salmonella* spp.**

A *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, são bacilos Gram-negativos não produtores de esporos, sendo anaeróbios facultativos. Com a maioria sendo móvel, através de flagelos peritríquios, exceção à *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*.

São fermentadores de glicose, oxidase negativa, catalase positiva, indol, Voges-Proskauer – VP, Vermelho de Metila – VM, malonato e ureia negativa. Produzem gás sulfídrico a partir da redução do enxofre por ação da enzima cisteína desulfidrase. Ainda como reações metabólicas apresentam a capacidade de descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina, redução de nitrato a nitrito e utilização do citrato como única fonte de carbono podendo ocorrer alterações em função do sorovar e/ou da subespécie. (Rodrigues, et al., 2010). Atualmente apresentam 2.659 sorovares de *Salmonella* spp. identificado e classificados segundo o esquema de Kauffman & White, sendo diferenciados com base na composição dos seus antígenos de parede, mais precisamente na combinação entre seus antígenos somáticos (O), flagelares (H) e os antígenos capsulares (Vi). O quadro 1 apresenta as espécies subespécies e distribuição quantitativa dos sorovares identificados até os dias atuais. (Ryan, O' Dwyer, et al, 2017).

O gênero *Salmonella* spp. é identificado a partir de suas características bioquímicas e antigênicas (Grimont et al., 2000; Popoff et al. 2004). A versão descrita por Grimont e Weill (2007), fundamentada em estudos de hibridização do DNA, divide o gênero *Salmonella* em duas espécies geneticamente distintas: *Salmonella enterica*, sendo esta subdividida em seis subespécies e *Salmonella bongori*, que neste caso não apresenta subespécie (Popoff et al. 2004; Cortez et al., 2006; Forshell; Wierup, 2006, Germano; 2008).



Quadro 1: Distribuição quantitativa dos sorovares de *Salmonella*, de acordo com as espécies e subespécies.

Espécies	Subespécies	Nº de sorovares
<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i>	1586
	<i>salamae</i>	522
	<i>arizonae</i>	102
	<i>diarizonae</i>	338
	<i>houtenae</i>	76
	<i>Indica</i>	13
<i>S. bongori</i>		22
Total		2659

Fonte: (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

O atual sistema de classificação baseia-se nos determinantes antigênicos de vários sorotipos de *Salmonella* estando em uso desde sua elaboração por Kauffmann mantendo-se ao longo de 80 anos de pesquisa sobre interações de anticorpos com os antígenos de superfície de *Salmonella*. As fórmulas antigênicas de todos os sorovares de *Salmonella* conhecidos são registradas no esquema de Kauffmann-White-Le Minor. O Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde para Referência e Pesquisa sobre *Salmonella* está localizado no Instituto Pasteur, em Paris, que mantém e atualiza o esquema. Sorovares recém-identificados são publicados na revista *Research in Microbiology*. Na última atualização publicada em 2014 foram registrados 2659 sorovares no gênero sendo 2637 em *Salmonella enterica* e 22 em *Salmonella bongori*.

O antígeno somático é composto por lipopolissacarídeos que fazem parte da parede celular bacteriana, sendo responsável por quadros febris quando lançados na corrente sanguínea do hospedeiro por sua endotoxidade (Grimont e Weill, 2007). O antígeno flagelar tem sua composição baseada em material proteico (flagelina) que se estendem além da parede celular tendo a função de locomoção da célula bacteriana (Grimont e Weill, 2007) As diferenças antigênicas surgem devido a variações na estrutura primária contendo aminoácidos das diferentes moléculas de flagelina. São termolábeis, que pode ser destruída pelo calor. O antígeno capsular (Vi) é encontrado em apenas alguns sorotipos de *Salmonella* como a *S. Typhi*, *S. Dublin*, *S. Hirschfeldii* e *S. Paratyphi C* (Grimont e Weill, 2007).

Em relação à grafia do gênero, espécie, subespécie e sorovares, considera-se internacionalmente aceito o esquema proposto pelo CDC (2012), no qual o gênero, a espécie e a subespécie são escritos em nomes e letras, por exemplo: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis. Por conveniência, costuma-se citar apenas o gênero e o sorovar, grafando-se, por exemplo, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis, etc.

Salmonella spp. ainda representam um dos mais relevantes patógenos e sendo mundialmente reconhecidos como agente etiológico das DTA, (doenças transmitidas por alimentos).

São abundantemente distribuídas no ambiente, sendo seu habitat natural o trato gastrointestinal do homem e de animais. A ausência de manifestação clínicas na maioria das espécies hospedeiras reflete seu papel como portadoras assintomáticas eliminando continuamente microrganismos das fezes (Germano; 2008).

São adaptadas ao hospedeiro humano a *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B e C, respectivamente, agentes da febre tifóide e Paratifóide (Humphrey, 2000; WHO, 2015). Vale ressaltar o papel dos animais de estimação como principais reservatórios de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Newport*.

Essa diversidade leva a classificação epidemiológica da *Salmonella* em três grupos distintos: o que podem infectar homens e animais, por não terem hospedeiro específica; *S. Enteritidis* as específicas de humanos (*S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B e C), sendo transmitidas de uma pessoa para outra de forma direta ou indireta; as espécie-específicas de animais (como *S. Pullorum* e *Gallinarum* em aves), que não ocasionam enfermidades em humanos (Caffer; Terragno, 2001).

Mudanças constantes vêm sendo observadas nos últimos anos em relação à distribuição, frequência e prevalência de determinados sorovares em diversos lugares do mundo. No entanto, esta mudança foi alterado com a emergência da *Salmonella* ser. Enteritidis foi detectada na década de 90, representando um sério problema no setor avícola e em saúde pública.

Particularmente no Brasil, há evidencias de alguns sorovares prevalentes como *S. enterica* sorovares Enteritidis, Typhimurium, Mbandaka, Minnesota, Panama, Infantis.

Estes detectados através de estudos epidemiológicos e de monitoramento demonstram oscilações quanto à sua frequência, no entanto se mantém presentes em níveis variáveis em todas as fontes da cadeia alimentar (Relatório Anual de 2018 (MS); Jajere S.M, 2019).

Um levantamento epidemiológico realizado pelo Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LRNEB, IOC/FIOCRUZ/RJ) apontou um panorama global dos sorovares de *Salmonella* spp. circulantes no país no período entre 2000 e 2009, retratando sua incidência em diferentes fontes da cadeia alimentar, incluindo isolados de fonte humana, alimentar, animal, ambiental, matéria-prima e rações (Rodrigues et al., 2010). Segundo os autores, o número de sorovares detectados neste período (em torno de 93), manteve-se relativamente constante, mas avaliando na ordem individualmente dentro do ranking de prevalência, onde se observa flutuações ano a ano. Neste estudo, foi possível reconhecer que particularmente *Salmonella* ser. Enteritidis foi considerada durante sete anos o sorovar prevalente em isolados de origem humana, cujos índices diminuíram a partir de 2004, dando lugar a *Salmonella* ser. Typhimurium. Em cepas de origem animal, entre os 10 prevalentes nos anos de 2008 e 2009, destacaram-se a *S. enterica* sorovares Typhimurium, Enteritidis e Schwarzengrund, enquanto que para as provenientes de matéria-prima, rações e ambiente, os índices apontaram a prevalência de *S. Agona*, *S. Panama*, *S. Minnesota* e *S. Senftenberg*, envolvendo diferentes regiões do país. Em cepas de origem alimentar, foi observado aumento na incidência de *Salmonella* ser. Corvallis, exótico em nosso meio, vêm sendo evidenciado nos últimos anos, desde sua introdução em 2007 (Rodrigues et al., 2010), reduzindo sua casuística a partir de 2012.

Assim como acrescentam-se para o aumento como o alimento, na incidência das DTA, tais como a maior exposição das populações a alimentos destinados ao pronto consumo coletivo (fast-foods), o consumo de alimentos em vias públicas, a utilização de novas modalidades de produção, o aumento no uso de aditivos e a mudanças de hábitos alimentares, sem deixar de considerar e o mais relevante são as mudanças ambientais, a globalização e as facilidades atuais de deslocamento da população, em nível nacional e internacional. (<http://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-maio-de-2017>).

Mecanismos de Resistência bacteriana

Os antimicrobianos tem-se mostrado um grande sucesso e sem dúvida, constituem uma das relevantes descobertas científicas que colaboram para a redução da morbidade e mortalidade humana. Porém, o uso intensivo e sem controle de tais medicamentos resulta no surgimento de resistência em vários patógenos, reduzindo as possibilidades para o tratamento das infecções e doenças.

O conhecimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos é de grande importância para se entender como a bactéria pode desenvolver a resistência aos antimicrobianos. Entre os principais mecanismos, se destacam a produção de enzimas que destroem ou inativam as drogas, alterações na permeabilidade da membrana impedindo ou dificultando a penetração do antimicrobiano, hiper expressão de bombas de efluxo e alteração do sítio alvo do antimicrobiano (Schwarz e Chaslus-Dancla, 2001, Alekshun e Levy, 2007)

Sobre tais mecanismos este pode interferir na escolha do medicamento mais adequado ao tratamento empírico das infecções do trato urinário, assim como nos estudos sobre o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (Ruppé et al, 2015). Ambos estão ligados a mecanismos genéticos envolvidos no desenvolvimento de resistência a antimicrobianos: incluindo mutações e aquisição de genes de resistência por transferência horizontal que resultam em recombinação genética.

Com o aumento de resistência, tem elevado o número substancial da morbimortalidade. Surtos ocasionados por cepas Gram-negativas multirresistentes durante a última década ameaçam o sucesso do tratamento de infecções. O reservatório mais substancial destas bactérias é o trato intestinal do homem e dos animais, especialmente aqueles que estão recebendo antibióticos. A contaminação da água, alimentos e meio ambiente com bactérias multirresistentes é uma rota importante para a sua propagação, sejam o homem os animais, portanto, representa uma área crucial para o controle.

Nos países desenvolvidos, por exemplo, fenótipos de resistência antimicrobiano observados em *Salmonella* têm sido associados ao uso de antimicrobianos em animais de produção onde os perfis de resistência geralmente refletem o tempo que uma droga está em uso, e a reversão desta característica, associada ao seu desuso. (Tese, Regitano, 2010).

Um dos primeiros e mais efetivos mecanismos de resistência bacteriana conhecidos é a produção de enzimas, entre elas as betalactamases, Nesta a inativação enzimática do fármaco ocorre com a produção de enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, inativando o antimicrobiano e impedindo, assim, que ele apresente atividade contra as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana (Alves & Behar, 2013).

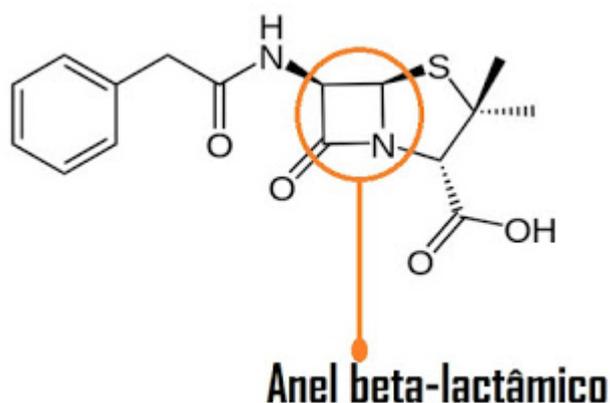


Figura 1: Fórmula química do Anel β -lactâmico.(pt.wikipedia.org.)

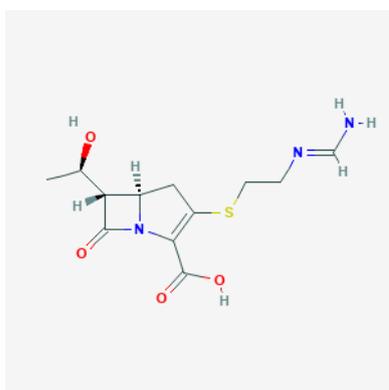
O aumento de bactérias produtoras de beta-lactamases espectro estendido no início dos anos 2000 na Europa foi um dos fenômenos mais dramáticos sobre o aparecimento da resistência. A contaminação do solo, de fontes de água e de diversos ambientes com antimicrobianos e a persistência destes no ambiente tem acelerado o processo de seleção de variedades resistentes aos antimicrobianos, agravando o problema (Wellington et al, 2013).

Essa resistência tende a se espalhar rapidamente no ambiente, dificultando o controle (Ruppé et al., 2015). Os genes de resistência adquiridos por mutações espontâneas podem ser transferidos por plasmídeos ou tranposons, entre bactérias das mesmas espécies ou espécies diferentes, contribuindo para sua dispersão.

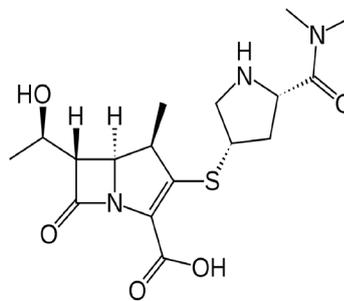
Pode ocorrer também mutação em um gene que promova ação cumulativa a mais de uma droga o que promove o aparecimento de bactérias multirresistentes. (Paterson, 2003)

Os carbapenêmicos são antibacterianos que possuem um amplo espectro de ação e grande estabilidade à maioria das β -lactamases (Gautier,2018)

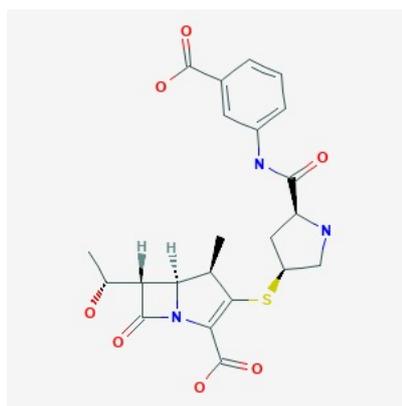
Assim, por serem drogas de amplo espectro e com penetração na maioria dos sítios de infecção, os carbapenêmicos podem ser utilizados no tratamento de infecções aeróbia e anaeróbia ou ocasionados por organismos multirresistentes.



Imipenem



Meropenem



Ertapenem

Figura 2: Fórmula química dos antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos.(pt.wikipedia.org.).

Embora imipenem e meropenem possuam o mesmo mecanismo de ação, algumas diferenças em sua ação *in vitro* e mecanismos de resistência, podem impactar diretamente na resposta clínica em infecções por Gram-negativos.

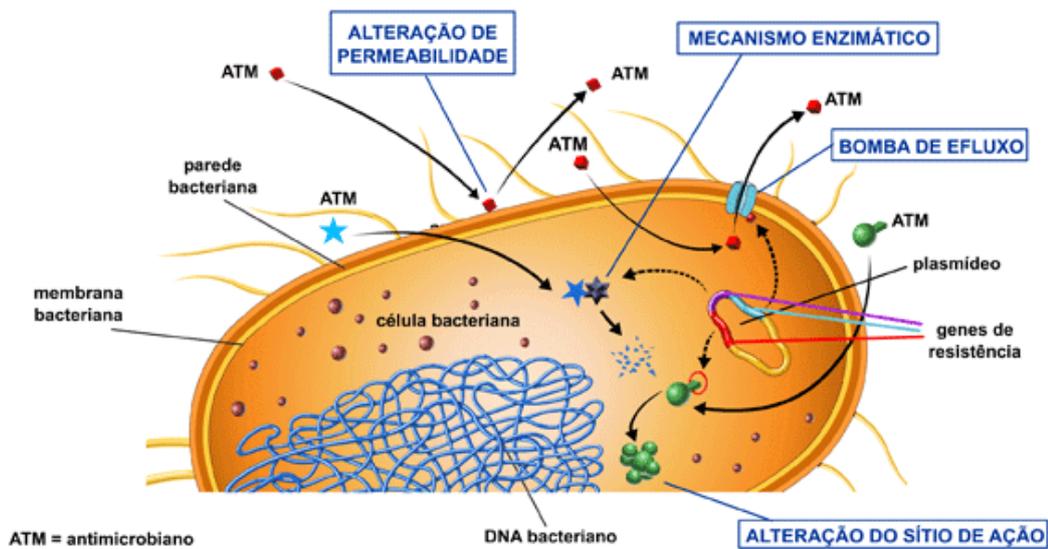
A produção de enzimas β -lactamase que podem hidrolisar carbapenêmicos (carbapenemases) é um dos principais mecanismos de resistência das enterobactérias. De acordo com a classificação existente, as carbapenemases pertencem às classes moleculares A (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - KPC), B (metalobetalactamase, das quais VIM, IMP e NDM são os principais tipos) e D (oxacillinase - representada pelo tipo OXA-48).

A KPC é um dos tipos epidemiologicamente mais importantes devido à sua disseminação mundial. (Poirel et al, 2012, Meletis, 2016, Lavagnoti, 2017).

As carbapenemases podem ser transferidas entre diferentes cepas, geralmente por pequenas moléculas de DNA (ácido desoxirribonucleico) circular como os plasmídeos, que podem se replicar independentemente do DNA cromossômico e permitir a troca de material genético entre diferentes gêneros e espécies de enterobactérias. A transferência horizontal de genes pode envolver múltiplos agentes patogênicos e se disseminar em um ambiente. (Lavagnoti, 2017).

Conforme a sua estabilidade às β -lactamases, enzimas frequentemente detectadas em enterobactérias, os carbapenems, apresentam alta eficácia no controle de infecções por enterobactérias quanto a outros β -lactâmicos (Nicolau, 2008).

Mecanismos de resistência bacteriana



www.Anvisa.gov.br

Figura 3- Mecanismos de resistência aos β - lactâmicos em enterobactérias.

Inativação enzimática do antibiótico por enzimas codificadas por plasmídeo ou cromossomo. Diminuições da permeabilidade da membrana externa por modificação das porinas, por onde os β -lactâmicos da célula bacteriana, perda de expressão de porina ou substituição do tipo de porinas. Efluxo do antimicrobiano para fora da célula bacteriana (Nordmann; Dortet; et al., 2012).

3 - JUSTIFICATIVA:

- Confirmar o perfil das amostras de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. isoladas de fontes humana, animal, ambiental no período de 2014 a 2017.
- Verificar as cepas resistentes aos antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos, caracterizados como resistente ou intermediária empregando drogas IMP, MEM, ERT, incluindo COL para *E. coli*.
- Para *Salmonella*, empregando drogas IMP, MEM, ERT.
- Em sequência testar as cepas no PCR com os genes: *bla*_{KPC} (do inglês, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases), *bla*_{IMP} (Imipenemase), *bla*_{VIM} (Verona integron–encoded metallo- β -lactamase), *bla*_{NDM} (New Delhi metallo- β -lactamase) e *bla*_{OXA-48} (oxacillin-hydrolyzing) .

4 – OBJETIVOS:

Nos cinco últimos anos o Brasil sediou eventos de grande magnitude com aumento da população, devido à chegada de turistas, visitantes e delegações. Durante este período podem ter ocorrido doenças veiculadas através da água, animais e nos humanos. Contudo, de modo sorrateiro, podemos ter tido a eliminação de diferentes microrganismos portadores de características exóticas, através da microbiota desta população, a qual foi naturalmente eliminada em nosso sistema de esgotamento sanitário. Assim dada à precariedade do conhecimento sob o ponto de vista sanitário e sua relevância, iremos avaliar se esta complexa cadeia representa condição de risco para a população residente, especialmente considerando a emergência global de resistência aos antimicrobianos no grupo dos carbapenêmicos.

5 - MATERIAL E MÉTODOS:

5.1 - Amostragem de estudo: seleção em banco de dados de 120 cepas de *Escherichia coli* (40) e *Salmonella* (80) isoladas no período de 2014-2017 que apresentaram perfil intermediário e resistente ao Imipenem. As cepas fazem parte do acervo da coleção de cultura do Laboratório de Enterobactérias/Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas / IOC / FIOCRUZ, cujas informações epidemiológicas e referentes à avaliação laboratorial efetivada se encontram em banco de dados. Todas as amostras se mantêm conservadas em ágar nutriente tamponado 0,5% em temperatura ambiente e Skim Milk a -70°C.

5.2 - Recuperação das cepas: as cepas mantidas em Agar Nutriente Fosfatado (DIFCO) foram inoculadas em Caldo Nutriente (DIFCO) e incubadas a 37°C por 12/18 horas e posteriormente semeadas em Agar Entérico Hecktoen – *Salmonella* (OXOID) e EMB (eosyne methileno blue) *E. coli* (OXOID). Após 18 – 24 h/ 37°C, as colônias com características de *Salmonella* (não fermentadoras de lactose e produtoras de gás sulfídrico) no Hecktoen, foram repicadas para meio de triagem de Costa e Vérnin para diagnóstico presuntivo. (Costa e Hofer, 1972; Manual Bergey, 2015).

E em relação as *E. coli*, as colônias com características de fermentadoras de lactose, foram repicadas no meio de triagem de Costa e Vernin (CV) para diagnóstico presuntivo.

5.3 - Confirmação do perfil bioquímico: a confirmação do perfil bioquímico foi avaliada através da metodologia descrita por (Costa e Hofer, 1972; Manual Bergey, 2015) e Edwards e Ewing (1986). Foram realizados os testes de produção de gás em meio de glicose, capacidade de utilização do citrato como única fonte de carbono em meio Citrato de Simmons (DIFCO), avaliação da mobilidade, produção de gás sulfídrico e de indol em meio de SIM (DIFCO), e capacidade de descarboxilação do aminoácido lisina.

5.4 - Diagnóstico conclusivo sorológico: a partir da confirmação do perfil bioquímico, as cepas foram semeadas em ágar nutriente inclinado (DIFCO) incubado 18 - 24 horas/37°C para a confirmação da estrutura antigênica. O diagnóstico antigênico conclusivo foi efetuado através da técnica de soroaglutinação rápida em lâmina, com antissoros poli e monovalentes, somáticos (O) e flagelares (H), produzidos pelo Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LRNEB), do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ.

A caracterização antigênica de *Salmonella* foi realizada pelo esquema sorológico proposto por Kauffmann-white e Le Minor e de acordo com os critérios de Grimont e Weill, (2007) e Guibourdenche et al. (2010), e as recomendações para *E. coli* de Edwards e Ewing, (1986).

5.5 – Manutenção de cepas: Após a caracterização antigênica conclusiva, as cepas foram preservadas a -20°C em tubos de criopreservação em Skin – milk.

6 - Confirmação e Determinação do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos:

A seleção toda foi este perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizada em 80 cepas de *Salmonella* spp., e de 40 *E. coli* através do método de difusão de disco em ágar. As metodologias empregadas para a avaliação da suscetibilidade foram utilizadas os critérios preconizados pelo CLSI (2019).

6.1 - Teste de difusão em discos (TSA):

Os testes de difusão em disco foram efetuados em cepas previamente identificadas segundo a metodologia recomendada pelo CLSI (2019).

6.2 - Preparo do inoculo:

As cepas de *Salmonella* e as de *E. coli* foram semeadas por esgotamento em Ágar Nutriente (OXOID) e incubadas a 37° C por 24 horas, para obtenção de colônias isoladas.

A padronização do inoculo foi obtida a partir da seleção e repique de 4 a 5 colônias de cada cepa em 4,0 mL de Caldo Mueller-Hinton - MH (OXOID), sendo incubadas a 37° C por 2 a 6 horas até se obter uma turvação e com o auxílio de fotocolorímetro (Densichek plus-Biomerieux) equivalente a 0,5 da escala de Mac Farland (1×10^8 UFC/ml).

6.3 – Antimicrobianos Avaliados:

Interpretação do Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos, CLSI humano e veterinário (2019) Como mostra a tabela 1 abaixo.

6.4 - Procedimento da técnica

Os testes de difusão em disco foram efetuados segundo a metodologia recomendada pelo CLSI (2019) utilizando o Ágar Mueller-Hinton - MH (OXOID), preparado e esterilizado de acordo com as recomendações do fabricante, distribuído em placas de Petri de 90 x100 mm de diâmetro, em volume de aproximadamente 22 mL, visando obtenção de camada interna de 4 mm de profundidade.

A semeadura foi realizada com auxílio de swab em três direções (horizontal vertical e diagonal). Os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura com o auxílio de um dispensador (OXOID), após a absorção do inoculo, sendo posteriormente incubados por 18-24 horas a 35° C.

Tabela 1: Padrão de Interpretação do Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos, CLSI humano e veterinário (2019).

Agente Antimicrobiano	Concentração do Disco	Diâmetro da Zona (mm)		
		S	I	R
Imipenem (IMP)	10 µg	≥23	20 – 22	≤19
Meropenem (MEM)	10 µg	≥23	20 – 22	≤19
Ciprofloxacina (CIP) <i>Salmonella</i> spp.	5µg	≥31	21 – 30	≤20
Ciprofloxacina (CIP) Enterobacteriaceae	5µg	≥21	16 – 20	≤15
Ampicilina (AMP)	10 µg	≥17	14 – 16	≤13
Ceftriaxona (CRO)	30µg	≥23	20 – 22	≤19
Cefoxitina (FOX)	30µg	≥18	15 – 17	≤14
Ceftazidima (CAZ)	30µg	≥21	18 -20	≤17
Gentamicina (GEN)	10µg	≥15	13 – 14	≤12
Tetraciclina (TCY)	30µg	≥15	12 – 14	≤11
Sulfametoxazol- Trimetoprim (SXT)	1.25/23.75µg	≥16	11 – 15	≤10
Cloranfenicol (CHL)	30µg	≥18	13 – 17	≤12
Nitrofurantoína (NIT)	300µg	≥17	15 – 16	≤14
Ácido Nalidíxico (NAL)	30 µg	≥19	14 – 18	≤13

R - resistente I - Intermediário S - Sensível
 µg - micrograma
 mm - Zona de inibição avaliado em milímetro

6. 5 - Leitura e Interpretação

Após o período de incubação os diâmetros dos halos formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos foram observados e medidos, em milímetros com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo – Absolute Digimatic) (Kohner et al., 1999). Os valores obtidos foram interpretados, segundo CLSI (2019) na tabela padrão de interpretação do teste de suscetibilidade antimicrobiana pelo método disco-difusão. (Quadro 2). E para o teste de Concentração Mínima Inibitória.(MIC).

7 – Concentração Mínima Inibitória (MIC):

7.1 – Preparo do Inoculo:

Para a realização desta técnica foi utilizado o Caldo Mueller-Hinton OXOID (CLSI 2019), previamente preparado de acordo com as recomendações do fabricante, ajustando o pH entre 7,2 e 7,4 a cada partida de meio. Posteriormente, foi acrescido ao caldo o volume de solução antimicrobiana previamente preparada tomando-se por base as concentrações (variando de 0,5 a 8 diferentes) recomendadas pelo CLSI. Foi distribuído 50µL de meio de cultura (acrescido de solução antimicrobiana), em placas de macrotitulação esterilizadas. Estas foram vedadas com para-filme e armazenadas na geladeira.

O preparo do inoculo seguiu os mesmos procedimentos descritos na técnica em difusão em disco.

Quadro 2 – Critérios interpretativos das avaliações dos antibióticos utilizados e sua Concentração Mínima Inibitória (MIC), de acordo com o CLSI – 2019.

Antimicrobiano/ Potencia do Disco/MIC	Disco- Difusão			Concentração Inibitória Mínima (MIC)		
	Sensível (m/m)	Intermediário (m/m)	Resistente (m/m)	Sensível (µg/mL)	Intermediário (µg/mL)	Resistente (µg/mL)
Imipenem/ 10 µg	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Meropenem/ 10µg	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Ertapenem/ 10 µg	-	-	-	≤0, 5	1	≥2
Colistina	-	-	-	≤2	-	≥4

Conforme o acordo com LCDC , não existem o teste de difusão em disco para o Ertapenem e nem para a Colistina.

7.2 - Execução da Técnica de Macrodiluição:

Para a determinação da concentração mínima inibitória em placas de macrotitulação, foram inoculadas e adicionado nas placas previamente sensibilizadas com caldo/ solução antimicrobiana em cinco diferentes concentrações. Após a semeadura das cepas a serem analisadas nas placas estas foram incubadas por 18 às 24h/35°C.

Quadro 3 - Solvente e diluente utilizado no preparo da solução antimicrobiana, de acordo com o CLSI 2019 (de uso humano e veterinário).

ANTIMICROBIANO	MARCA	SOLVENTE(Sigma)	DILUENTE(Sigma)
Imipenem	Sigma	Phosphate buffer, pH 7.2, 0.01 mol/L	Phosphate, pH 7.2. 0.01 mol/L
Meropenem	Sigma	Água	Água
Ertapenem	Sigma	Phosphate buffer, pH 7.2, 0.01 mol/L	Phosphate, pH 7.2. 0.01 mol/L
Colistina	Sigma	Água	Água

7.3 - Interpretação e divulgação dos resultados:

Para a realização da leitura, as placas foram colocadas em superfície escura não reflexiva, para observar a presença ou ausência de turvação. A leitura é efetuada com base na observação de turbidez do último orifício com crescimento bacteriano e interpretada de modo quantitativo ou qualitativo, cujos critérios integrados, são apontados e revisados anualmente pelo CLSI- 2019.

7.4 – Cepas Padrões:

Os experimentos foram testados pelo controle de qualidade que são determinados através da avaliação dos antimicrobianos por cinco dias consecutivos utilizando as seguintes cepas padrão:

- *Escherichia coli* ATCC 25922 – avaliação geral da bateria dos antimicrobianos.

Os resultados são registrados e avaliados quanto aos níveis aceitáveis.

Os valores referentes aos halos de inibição das cepas utilizadas para controle estão descritos no Manual do CLSI, Revisado Anualmente.

8 - Detecção molecular de genes *bla* por meio da reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR).

A PCR tem sido atualmente, considerado uma estratégia utilizada e citada por muitos autores como eficiente e rápida para detecção de vários micro-organismos, assim como para estudos de caráter epidemiológico nas avaliações de genes associados à virulência e resistência aos antimicrobianos. Como uma variação da PCR tradicional, a PCR multiplex pode ser utilizada, como um método alternativo para a detecção simultânea de sequências-alvo numa mesma amostra. É considerada uma técnica simples e rápida, baseada em uma reação de amplificação desenhada que permite reconhecer múltiplas sequências a partir de primers com cadeias de oligonucleotídeos para amplificar regiões repetitivas do DNA genômico, empregado em estudos epidemiológicos.

A técnica de PCR simplex e multiplex, tem utilizada para o diagnóstico e a avaliação de marcadores de virulência e resistência em *Salmonella* spp. e para *E. coli*. (Nayzaki et al.2004; Castilla et al. 2006; Chiu et al. 2006; Okamoto 2009; Cesco 2010). Assim, desde a sua descoberta, diversas adaptações têm sido realizadas, revelando um significativo número de aplicações, particularmente na epidemiologia das infecções.

É importante ressaltar que em todas as avaliações, estes autores admitem que a escolha de um único método de tipificação pode ser insuficiente para a identificação correta de uma linhagem. Sendo assim, o que se tem observado é a utilização de sistemas múltiplos de tipagem, aonde a combinação entre métodos fenotípicos e moleculares vem sendo empregados como uma ferramenta essencial para o reconhecimento de características epidemiológicas e de patogenicidade, com o intuito de fornecer informações sobre a ocorrência da *Salmonella* spp. e de *E. coli* na natureza, assim como sua evolução e alterações fisiológicas e genéticas.

8. 1 - Amostragem das cepas: Para a caracterização de genes de resistência foi utilizada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em cepas que apresentaram o perfil intermediário ou resistente para as classes dos Carbapenamases.

Foram utilizados os seguintes primers (KPC, NDM, VIM, IMP e OXA-48), os genes foram avaliados através da PCR multiplex empregando kit (Qiagen) para extração (Figura 4). As reações de amplificação foram preparadas em volume de 25 μ L e a amplificação em termociclador com programação específica de acordo com Poirel et al, 2011. Ao final das amplificações, o produto obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose ~1 h/ 80V, com padrão de peso molecular (Amersham Pharmacia) incluído em cada gel. Após a migração, os produtos foram corados, com solução de EtBr, visualizados em Sistema de Fotodocumentação (Image Master) e, em seguida, digitalizadas e salvas em banco de dados do software Bionumerics.

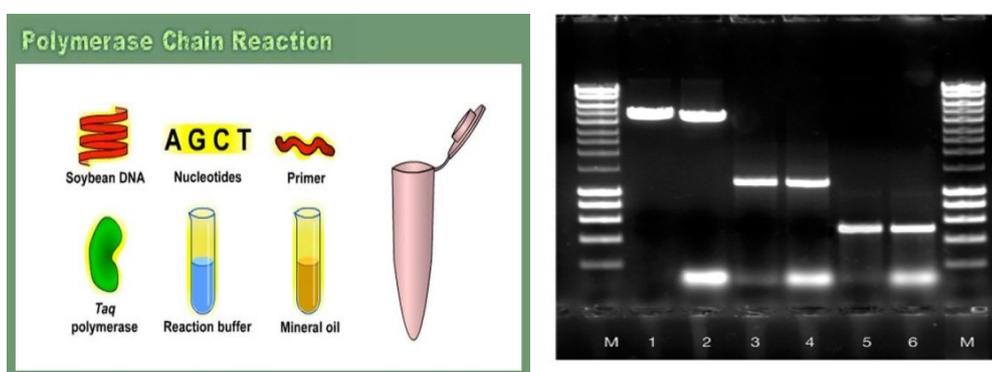


Figura 4: Representação gráfica da técnica do PCR (unilago.edu.br/ pt. Khanacademy.org)

8. 2 - Extração e Purificação de DNA:

Considerando a ampla disseminação e recepção de DNA, uma amostragem será tomada para extração e subsequente sequenciamento do DNA será utilizado o mini kit QIAGEN para obter o DNA na concentração de 50nm, efetivando a medição através do Nanodrop. O DNA será em sequência separado em alíquotas, sendo uma delas analisada através da corrida eletroforética, para determinação do grau de pureza.

8.3 - Técnica de Amplificação:

A amplificação foi realizada com a seguinte técnica do ciclo: 10 minutos a 94 ° C e 36 ciclos de que consiste em amplificação de 30 s a 94 ° C, 40 s a 52 ° C, e 50 s a 72 ° C, com 5 min a 72 ° C para a extensão final. Os produtos foram submetidos a a eletroforese em um gel de agarose a 100 V durante 1 h em 1 × TAE buffer (40 mmol / L Tris-HCl [pH 8.3], 2 mmol / L-acetato, 1 mmol / L de EDTA) (Poirel et al. 2011, Haas, Torres, 2016).

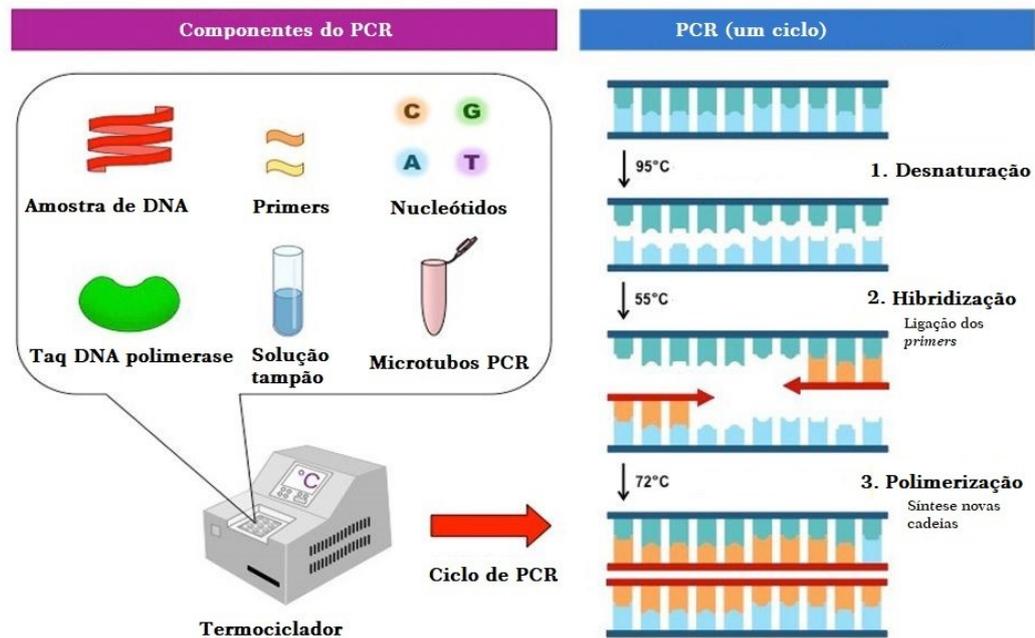


Figura 5 – Representação gráfica da técnica de PCR.(pontobiologia.com.br)

Logo abaixo estão o **quadro 4, a e b** referentes os primers utilizados, suas seqüências e pares de bases junto com as cepas positivas dos primers testados, incluindo o *mcr -1* de *E. coli*.

Quadro 4: Seqüencia de Nucleotídeos empregados na caracterização de genes de resistência em *Salmonella* spp. e *E. coli*, segundo Poirel et al, 2011.

Primers ^a	Sequence (5' – 3') ^c	Gene (pb)
IMP-F IMP-R	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC GGTTTAAAYAAAACAACCACC	IMP 232
VIM-F VIM-R	GATGGTGTGGTTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	VIM 390
OXA-F OXA-R	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCCAACCG	OXA-48 438
NDM-F NDM-R	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	NDM 621
KPC-Fm KPC-Rm	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	KPC 798

a F, sense primer; R, antisense primer.

b Nucleotide numbering begins at the initiation codon of genes.

c D = A or G or T; Y = C or T.

Quadro 4a: Sequencia de Nucleotídeos empregados na caracterização de gene de resistência de *E. coli*, conforme Yi-Yun; L. et al.,2016.

Primers	Sequencia (5'- 3'")	Gene (pb)
<i>mcr-1-F</i>	CGG TCA GTC CGT TTG TTC	304
<i>mcr-1 -R</i>	CTT GGT CGG TCT GTA GGG	

No quadro a seguir estão as cepas padrões que foram utilizadas para os controles positivos de todo os experimentos testados junto com seus primers.

Quadro 4b: Relação das cepas padrão empregadas como controle positivo nos experimentos de PCR.

Genes	Registro	Microrganismo
<i>bla</i> _{IMP}	CCBH 24223	<i>P. aeruginosa</i>
<i>bla</i> _{KPC}	ATCC BAA-1705	<i>K. pneumoniae</i>
<i>bla</i> _{VIM}	CCBH 20009	<i>P. aeruginosa</i>
<i>bla</i> _{OXA - 48}	CCBH 23784	<i>K. pneumoniae</i>
<i>bla</i> _{NDM}	ATCC BAA - 2146	<i>K. pneumoniae</i>

9 – RESULTADOS:

Foram avaliadas 120 cepas de enterobactérias, sendo 40 *Escherichia coli* e 80 *Salmonella* spp. que apresentaram em seu perfil resistência ou sensibilidade intermediária aos carbapenêmicos. A seleção foi efetuada no Banco de Dados do Laboratório de Referência Nacional e no Laboratório de Enterobactérias, a partir das informações referentes as atividades de monitoramento da resistência antimicrobianos realizada na totalidade de cepas recebidas para diagnóstico conclusivo e/ou subtipagem. No quadro 5 encontra-se as informações referentes às cepas de *E. coli*.

Quadro 5: Quantitativo de *E. coli* caracterizada no LRNEB distribuídas de acordo com a fonte de isolamento e estados brasileiros.

ANO	N° DE CEPAS (40)	ORIGEM (ESTADO)	FONTE DE ISOLAMENTO e N° DE CEPAS
2014	1	BA (1)	HU (1)
2015	16	RO (4) PE (1) GO (7) DF (3) RS (1)	HU (3) ND (1) HU (1) HU (7) HU (3) HU (1)
2016	12	RJ (12)	AB (12)
2017	11	RJ (2) ES (3) SE (2) GO (2) DF (2)	AN (2) HU (3) HU (2) HU (2) HU (2)

Estados: BA-Bahia, RO-Rondônia, PE-Pernambuco, GO-Goiás, DF-Distrito Federal, RS-Rio Grande do Sul, RJ- Rio de Janeiro, ES-Espirito Santo, SE-Sergipe.

ND – não determinado.

HU-humana, AB-ambiente, AN – animal.

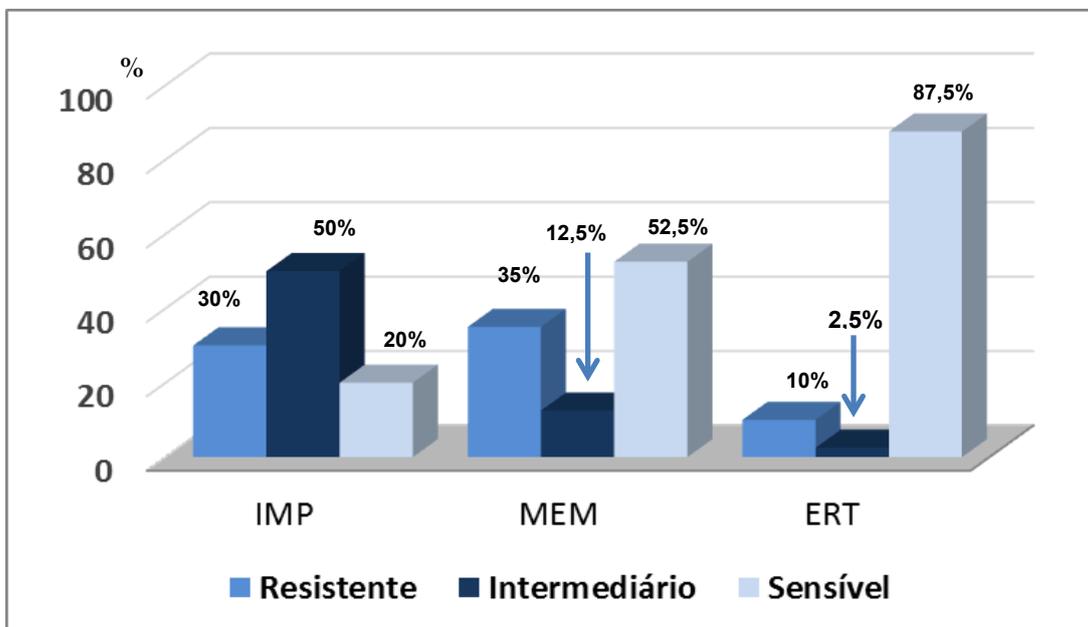
O total de cepas de *E. coli* foi avaliada antigenicamente não tendo sido observado aglutinação com antissoros de EPEC e EIEC. Em sequência foi determinado o perfil de suscetibilidade cujos resultados dos perfis individuais estão registrados na tabela 2. Estes apontaram que a totalidade das cepas teve confirmado o mesmo perfil no MIC, previamente detectado no teste de difusão em disco.

Tabela 2 – Perfis de Susceptibilidade de *E. coli*, com fonte de isolamento, o Estado e Genes, do período de 2014 a 2017.

Ano	Perfil de Susceptibilidade	Fonte de Isolamento	Estado	Perfil de Genes
2014	AMP, CAZ, IPM, NAL, SXT.	AN	BA	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{IMP} .
2015	I: STR, IMP, NAL.	HU	RO	<i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{OXA-48}
	AMP, TCY, SXT.	HU	RO	Negativo
	AMP, IMP	HU	RO	<i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{OXA-48}
	AMP/TCY	HU	PE	Negativo
	AMP, SXT	HU	GO	<i>bla</i> _{IMP}
	AMP, TCY	HU	GO	Negativo
	IPM	HU	DF	<i>bla</i> _{IMP}
	IPM	HU	DF	<i>bla</i> _{IMP}
	AMP	HU	DF	<i>bla</i> _{IMP}
	AMP, IMP, TCY, STR, SXT	HU	RO	<i>bla</i> _{IMP}
	GEN, I: IPM	HU	GO	<i>bla</i> _{IMP}
	IPM	HU	RS	<i>bla</i> _{IMP}
	AMP,TCY,STR,NAL,SXT	HU	RJ	Negativo
	AMP	HU	GO	Negativo
	CIP, NAL	HU	GO	Negativo
AMP,CHL,TCY,STR,NAL	HU	GO	<i>bla</i> _{KPC}	
2016	AMP, STR, IMP, NAL.	AB	RJ	Negativo
	AMP	AB	RJ	Negativo
	AMP, FOX, IMP, NAL.	AB	RJ	Negativo
	AMP, STR, IMP, NAL.	AB	RJ	Negativo
	AMP, STR, NAL.	AB	RJ	Negativo
	AMP, FOX, NAL.	AB	RJ	Negativo
	AMP, NAL	AB	RJ	Negativo
	TCY, NIT	AB	RJ	Negativo
	I: IPM	AB	RJ	Negativo
	I: IPM	HU	GO	Negativo
	AMP,STR,SXT	HU	GO	Negativo
	I: CAZ,STR,IPM	HU	GO	Negativo
2017	AMP,TCY,STR,NAL,SXT	AN	RJ	Negativo
	I: STR,IPM	AN	RJ	<i>mcr-1</i>
	AMP, STR	HU	ES	Negativo
	NIT	HU	SE	Negativo
	CIP	HU	SE	Negativo
	I: STR	HU	GO	Negativo
	AMP	HU	ES	Negativo
	I: STR, IPM	HU	ES	Negativo
	AMP,TCY,FOX,CAZ,STR,CIP,GEN, IPM,NAL,SXT	HU	GO	<i>bla</i> _{KPC}
	I: STR, IPM	HU	DF	Negativo
I: STR, IPM	HU	DF	Negativo	

I: Intermediário. AMP= ampicilina, CHL=cloranfenicol, TCY= tetraciclina, FOX,= cefoxitina, CAZ= ceftazidima, STR=estreptomicina, CIP= ciprofloxacina, GEN= gentamicina, IMP= imipenem, NAL= acido nalidixico, STX= sulfametrozol-trimetropim, NIT= nitrofurantoina.(n°40 cepas)

Em geral, das 40 *E. coli* avaliadas por MIC a resistência ao imipenem foi caracterizado em 30% das cepas, Meropenem de 35% e 10% para Ertapenem e naquelas com perfil “intermediário” o percentual observado para Imipenem foi de 50%, Meropenem 12,5% e Ertapenem 2,5%.



IMP – Imipenem; MEM – Meropenem; ERT-Ertapenem.

Resistente:

Imipenem → 30%

Meropenem → 35%

Ertapenem → 10%

Intermediário:

Imipenem → 50%

Meropenem → 12,5%

Ertapenem → 2,5%

Sensível:

Imipenem: 20%

Meropenem: 52,5%

Ertapenem: 87,5%

Gráfico 1: Avaliação percentual do Perfil de Susceptibilidade *E. coli* aos carbapenems.

Particularmente nos resultados para colistina a determinação da concentração mínima inibitória permitiu evidenciar que 15/40 apresentaram resistência, equivalendo 37,5% das cepas, com prevalência no ano 2016.

Na etapa subsequente foi observado a produção de genes no PCR para a colistina e para as carbapenemases.

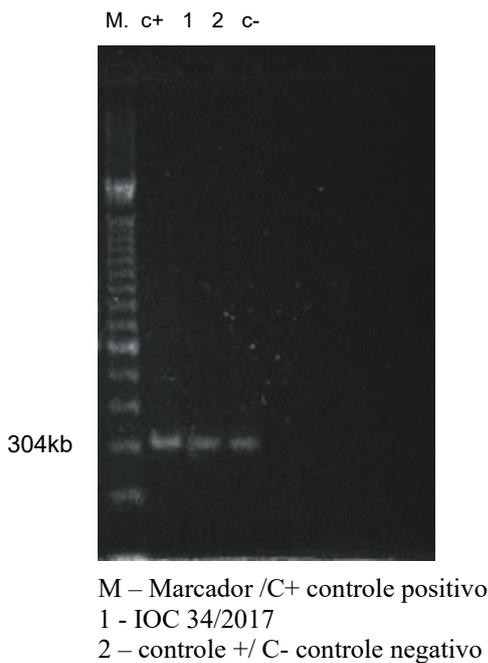


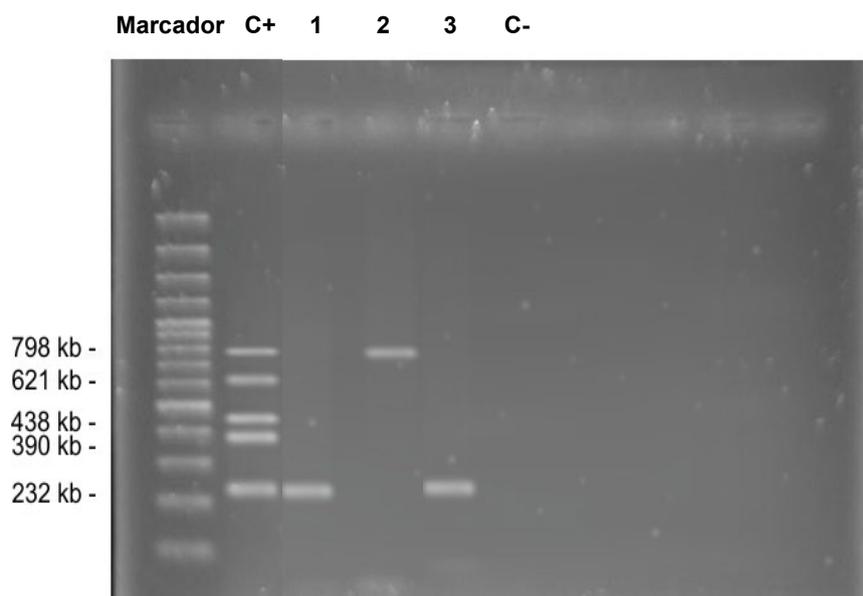
Figura 6: Produto da amplificação dos gene do *mcr* -1 da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em *E.coli* (colistina).

Das 40 cepas avaliada apresentaram resultados positivos, nove cepas para o *bla_{IMP}*, três cepas para o *bla_{KPC}* e dois para o *bla_{OXA-48}*.

As cepas que se destacaram foram: 02/14 detectados dois genes o *bla_{IMP}* e o *bla_{KPC}*. As cepas 758/15 e 277/17 são somente o gene *bla_{KPC}*, e as cepas com o gene *bla_{IMP}* foram em torno de sete cepas no ano de 2015, mais as cepas 26/15 e 33/15 foram encontrados dois genes o *bla_{IMP}* e o *bla_{OXA-48}*. A cepa 34/17 foi a única que apresenta o *mcr*-1 que foi encontrado de origem animal.

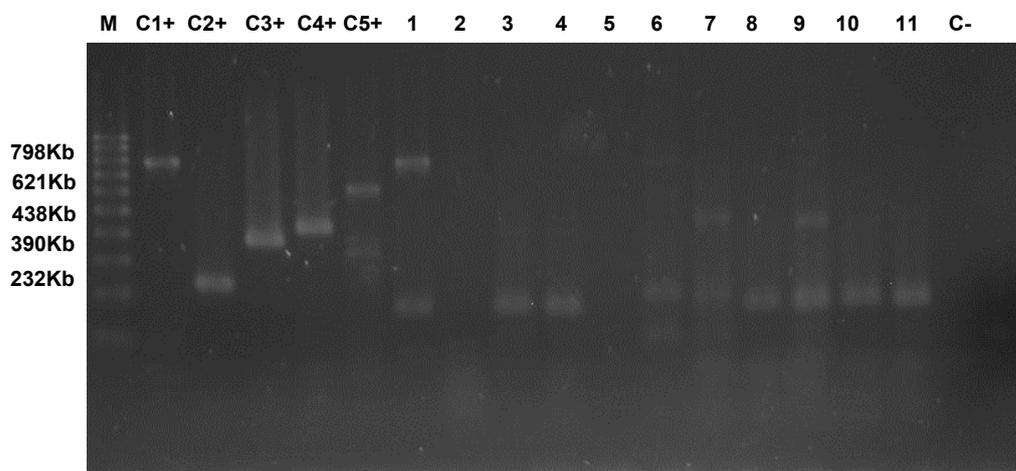
Em relação à detecção de genes relacionados à resistência a carbapenêmicos 22,5% das cepas resistentes são *bla_{IMP}*, 7,5% *bla_{KPC}* e 5% *bla_{OXA-48}* e 2,5% das cepas resistentes à colistina apresentaram o gene *mcr* -1. Sendo 37,5% de cepas que apresentaram genes pesquisados.

Na figura 7 foram mostrados alguns exemplos das cepas que se mostraram positivas para o gene *bla_{IMP}* e *bla_{KPC}* de *E. coli*.



Controles Positivos: 798Kb-*blaKPC*, 621Kb-*blaNDM*, 438Kb-*blaOXA48*, 390Kb-*blaVIM*, 232Kb-*blaIMP*;
Reações positivas: 1-IOC88/2015; 2- IOC758/2015; 3 - IOC116/2015
Controle Negativo: Branco

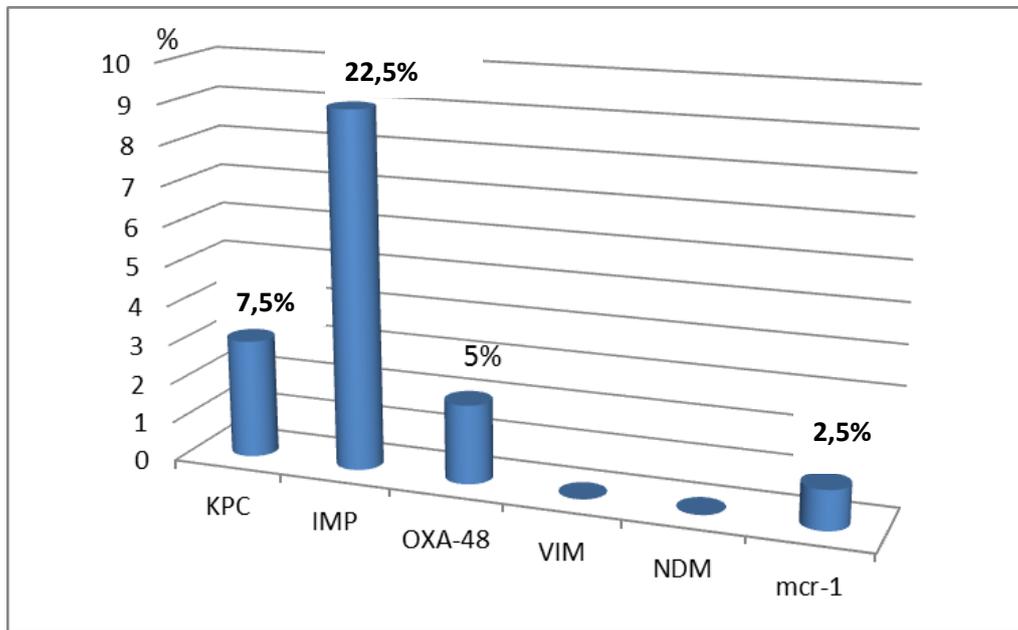
Figura 7 – Produto da amplificação dos genes de resistência para Carbapenems obtidos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em *E.coli*.



Controles positivos: C1+: *blaKPC*; C2+: *blaNDM*; C3+: *blaOXA48*; C4+: *blaVIM*; C5+: *blaIMP*;
Reações Positivas: 1- IOC 02/2014(*blaKPC* e *blaIMP*); 3- IOC88/2015 (*blaIMP*); 4- IOC116/2015 (*blaIMP*); 6- IOC119/2015 (*blaIMP*); 7- IOC26/2015 (*blaOXA48* e *blaIMP*); 8-IOC122/2015 (*blaIMP*); 9- IOC33/2015 (*blaOXA48* e *blaIMP*); 10 – IOC 217/2015 (*blaIMP*); 11- IOC230/2015 (*blaIMP*)
Reações Negativas: 2-IOC757/2015 e 5-52/2015
Controle negativo: Branco

Figura 8: Produto da amplificação dos genes de resistência para Carbapenems obtidos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em *E.coli*

Na figura 7 e 8 confirmando os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA-48} do estudo.



*bla*_{VIM} (Verona integron–encoded metallo-β-lactamase), *bla*_{NDM} (New Delhi metallo-β-lactamase)
*bla*_{OXA-48} (oxacillin-hydrolyzing) , mcr-1 – colistina

*bla*_{IMP} → 22,5% (9 cepas)

*bla*_{KPC} → 7,5% (3 cepas)

*bla*_{OXA48} → 5% (2 cepas)

mcr 1 → 2,5% (1 cepa - AN)

*bla*_{NDM} → 0

No total de 37,5% das cepas de *E. coli*. (25 cepas negativas)

Gráfico 2 – Percentual de genes de resistência detectados em *E. coli*.

No gráfico 2, foi possível verificar que 37,5% das cepas de *E. coli* que apresentaram os genes pesquisados. Destacando-se o *bla*_{IMP} para o percentual maior das cepas, completando com o gene *bla*_{KPC} com 7,5% e o gene *bla*_{OXA-48} com 5% de cepas. Evidenciando a colistina com o gene *mcr*-1 com 2,5% das cepas.

Na figura 9 mostra-se a relação das cepas de *E. coli* que apresentaram produtos de amplificação para mais de um gene. Cada gene está especificado o valor numérico e seu percentual em conjunto com outros genes.

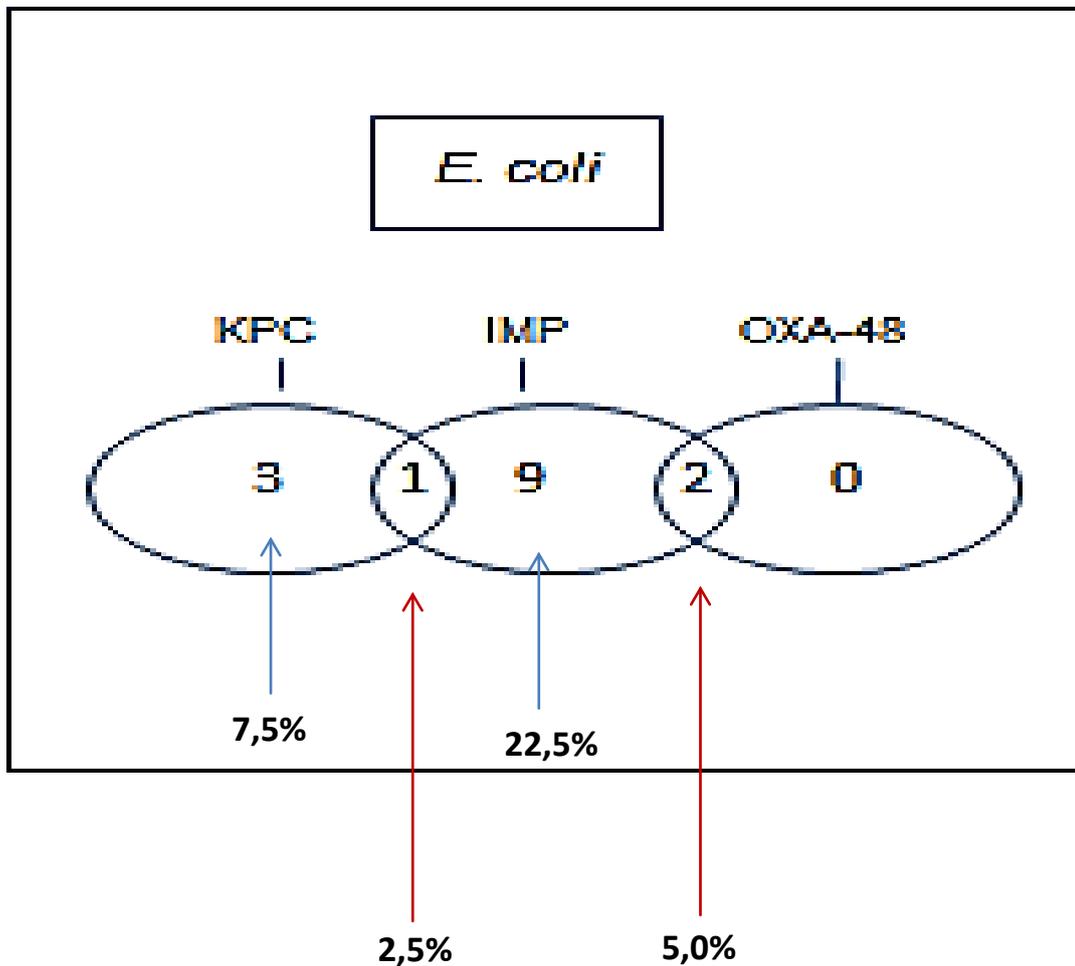


Figura 9: Esquema das cepas para os genes que se apresentaram para *E. coli*.

***Salmonella* spp.**

A partir da seleção em Banco de dados das 80 cepas que apresentaram em seu perfil, resultados intermediário ou resistente para carbapenêmicos (IMP, MEM, ERT) de acordo com o quadro 6, estas foram reavaliadas mantendo em 100% das amostras o perfil de resistência.

Quadro 6 – Distribuição de sorovares de *Salmonella* spp., identificadas pelo LRNEB, de acordo com o ano, fonte de isolamento e estados brasileiros.

ANO (N° Total de cepas) 80	SOROVARES	ESTADO (n ° de cepas)	FONTE DE ISOLAMENTO (n° de cepas)
2014 N = 8	S. Saintpaul (3) S. Typhimurium (4) S. Heidelberg (1)	PI (2) PE (1) MG (3) PE (1) PE (1)	HU
2015 N = 25	S. Corvallis (1) S. Newport (2) S. Panama (1) S. Typhimurium (8) S. Infantis (3) S. London (1) S. Ndolo (1) S. Muenchen (2) S. ent. Subsp. 9,12 (1) S. Schwarzengrund (1) S. Bredeney (1) S. Heidelberg (2)	MG(1) PE (1) RS (1) DF(1) GO(3) PR (1) MG(1) RS (1) MA (1) SC (1) GO (1) MS (1) PE (1) PR (1) SC (1) SC (1) PE (1) MA (1) PA (1) PE (1) GO (2)	HU (1) HU (2) HU (1) HU (8) HU (3) HU (1) HU (1) HU (2) HU (1) HU (1) HU (1) HU (2)
2016 N = 21	S. Montevideo (1) S. Hadar (1) S. Agona (1) S. Infantis (3) S. Mbandaka (1) S. Bredeney (1) S. Enteritidis (3) S. Oslo (2) S. Typhimurium (1) S. ent.subsp. 4,5 (1) S. Heidelberg (1) S. Schwarzengrund (1) S. Panama (1) S. Saintpaul (1) S. Johannesburg (1) S. Javiana (1)	BA (1) MG (1) MT (1) RS (1) SE (2) RS (1) MG (1) SC (1) GO (1) MS (1) SC (1) MA (1) MA (1) MA (1) MA (1) MG (1) BA (1) GO (1) SC (1) GO (1)	HU (1) HU (1) HU (1) HU (3) HU (1) HU (1) HU(3) HU (2) HU (1) HU (1) HU (1) HU (1) HU (1) HU (1) HU (1) AB (1)
2017 N = 26	S. Anatum (9) S. Gallinarum (1) S. Typhimurium (3) S. Schwarzengrund (1) S. Javiana (2) S. Saintpaul (1) S. Montevideo (1) S. Panama (1) S. Mbandaka (1) S. Muenchen (1) S. Muenster (1) S. London (1) S. Infantis (1) S. Rissen (1) S. Cerro (1)	PR (6) RS (1) MG (1) SP(1) GO (1) RS (2) SP (1) MG (1) MA(1) RS (1) MG (1) SP(1) SP (1) SP (1) SP (1) SP (1) SP (1) MG (1) MG (1) RO (1)	HU (1) AB (8) AN (1) HU (2) AN (1) AB(1) HU (2) HU (1) AN (1) AN (1) AN (1) AN (1) AB (1) AN (1) AN (1) AN (1) AN (1) HU (1)

HU – humana, AN – animal, AB - ambiente

Estados: BA-Bahia, RO-Rondônia, PE-Pernambuco, GO-Goiás, DF-Distrito Federal, RS-Rio Grande do Sul, RJ- Rio de Janeiro, ES-Espirito Santo, SE-Sergipe, MG:- Minas Gerais, SP-São Paulo, MA- Maranhão, PR- Parana, PI- Piaui, PA-Para, SC-Santa Catarina, MT- Mato Grosso do Sul.

No quadro 6, estão representadas as cepas identificação dos sorovares, os estados e suas fontes de isolamento

Tabela 3: Perfil feno/genotípico de suscetibilidade aos antimicrobianos detectadas em *Salmonella* spp.

ANO	SOROVARES	PERFIL DE RESISTÊNCIA	PERFIL DE GENES
2014	S. Saintpaul (3)	AMP, IMP AMP, FOX,IMP,NIT IMP	<i>bla</i> VIM <i>bla</i> VIM <i>bla</i> VIM
	S. Typhimurium (4)	AMP,TCY,FOX,CAZ,IMP,NAL,NIT AMP,CHL,TCY,IMP,NAL,NIT (2) AMP,CHL,TCY,CIP,IMP,NAL,NIT	Negativo <i>bla</i> VIM (2) <i>bla</i> VIM
	S. Heidelberg (1)	AMP,CHL,TCY,IMP,NAL,SXT,NIT	<i>bla</i> VIM
2015	S. Corvallis (1)	I: CAZ,CIP,IPM,NIT	<i>bla</i> VIM
	S. Panama (1)	CIP,IMP,NAL	<i>bla</i> VIM
	S. Typhimurium (8)	AMP,TCY,GEN,NAL,IMP	<i>bla</i> VIM
		AMP,TCY,CAZ,GEN,NAL,IMP	<i>bla</i> VIM
		AMP,TCY,GEN,NAL,IMP,NIT	<i>bla</i> VIM
		AMP,TCY,STR,GEN,IMP,NAL,NIT	<i>bla</i> VIM e <i>bla</i> OXA-48
		AMP,TCY,CAZ,STR,GEN,IPM,NAL	<i>bla</i> VIM
		AMP,TCY,STR,CIP,GEN,IMP,NAL,SXT,NIT	<i>bla</i> VIM
		STR	Negativo
		AMP,CHL,TCY,STR,GEN,IMP,NAL,NIT	<i>bla</i> VIM
	S. Infantis (4)	I: CIP,IMP,NIT (2) STR,CIP,IMP (2)	<i>bla</i> VIM <i>bla</i> VIM
		S. Newport	IMP I: STR,CIP,IMP,NAL,NIT
S. London	TCY, NIT	Negativo	
S. Ndolo	AMP,TCY,CAZ,STR,CIP,GEN,NAL	<i>bla</i> VIM e <i>bla</i> OXA-48	
S. Muenchen	AMP,TCY,STR,GEN,NAL	<i>bla</i> VIM	
	AMP,TCY,CAZ,,IMP,NAL	<i>bla</i> VIM	
S.ent.subs. O:9,12	IMP,NAL	<i>bla</i> VIM	
S. Schwarzengrund	IMP,NAL	<i>bla</i> OXA-48	
S.Bredeney	I: STR,CIP,IMP,NIT	<i>bla</i> VIM e <i>bla</i> OXA-48	
S. Heidelberg	NIT	<i>bla</i> VIM e <i>bla</i> OXA-48	
	IMP	<i>bla</i> VIM e <i>bla</i> OXA-48	

AMP= ampicilina, CHL=clorafenicol, TCY= tetraciclina, FOX,= cefoxitina, CAZ= ceftazidima, STR=estreptomicina, CIP= ciprofloxacina, GEN= gentamicina, IPM=Imipenem, NAL= acido nalidixico, SXT= sulfametrozal-trimetoprim, NIT= nitrofurantoina. I: Intermediário.

Continuação: Perfil fenotípico/genotípico de suscetibilidade aos antimicrobianos detectados em *Salmonella* spp.

ANO	SOROVARES	PERFIL DE RESISTÊNCIA	PERFIL DE GENES
2016	S. Montevideo	IMP, NAL,NIT	<i>bla</i> VIM
	S. Hadar	CHL, STR	<i>bla</i> VIM
	S. Agona	AMP,FOX,IMP,NAL	Negativo
	S. Infantis	I: CAZ,STR,CIP,IMP,NIT AMP,TCY,CAZ,STR,IMP,NAL,SXT,NIT AMP,TCY,CAZ,STR,IMP,NAL,SXT	<i>bla</i> VIM <i>bla</i> VIM e <i>bla</i> OXA-48 <i>bla</i> VIM
	S. Mbandaka	AMP,TCY,CIP,NAL,SXT	Negativo
	S. Bredeney	AMP,CAZ,IMP,NAL	Negativo
	S. Enteritidis	CIP,IMP NAL (2)	<i>bla</i> VIM Negativo
	S. Oslo	I: CIP,IMP,NAL IMP	<i>bla</i> VIM <i>bla</i> VIM
	S. Typhimurium	AMP,TCY,STR,NAL,SXT,NIT	<i>bla</i> VIM
	S. ent. subsp.0:4,5	I: STR,IMP	<i>bla</i> VIM
	S. Heidelberg	I: CIP,IMP	<i>bla</i> VIM
	S. Saintpaul	I: CIP,IMP	<i>bla</i> VIM e <i>bla</i> OXA-48
	S. S chwarzengrund	IMP,NAL,NIT	<i>bla</i> VIM
	S. Panama	I: CAZ,STR,CIP,IMP,NIT	<i>bla</i> IMP
	S. Johannesburg	NIT	<i>bla</i> VIM
S. Javiana	IMP	<i>bla</i> OXA-48	
2017	S. Anatum	STR,CIP,IMP I: CIP,IMP I: STR,IPM TCY,STR,CIP,NAL,NIT AMP TCY,NAL IPM,NAL NIT I: STR,CIP,IMP	<i>bla</i> VIM <i>bla</i> OXA-48 <i>bla</i> VIM <i>bla</i> VIM <i>bla</i> VIM <i>bla</i> VIM <i>bla</i> VIM <i>bla</i> VIM Negativo <i>bla</i> VIM
	S. Gallinarum	STR,CIP,NAL	Negativo
	S. Typhimurium	TCY,STR,NAL I: STR,CIP,NAL AMP,CHL,TCY,FOX,CAZ,STR,GEN,IMP,NAL,NIT	<i>bla</i> VIM e <i>bla</i> OXA-48 <i>bla</i> VIM Negativo
	S. Schwarzengrund	IPM,NAL	<i>bla</i> VIM
	S. Javiana	IPM,NIT FOX,CAZ,STR,NAL	Negativo
	S. Saintpaul	I: IMP,NIT	Negativo
	S. Montevideo	NAL	<i>bla</i> OXA-48
	S. Panama	I: STR,IMP	<i>bla</i> VIM
	S. Mbandaka	FOX,CAZ,STR,NAL,NIT	<i>bla</i> VIM
	S. Muenchen	FOX,CAZ,STR,NAL,NIT	<i>bla</i> VIM
	S. Muester	AMP,TCY,CAZ,STR,GEN,IMP,NAL	<i>bla</i> VIM e <i>bla</i> OXA-48
	S. London	I: CIP, IMP	Negativo
	S. Infantis	AMP,CHL,TCY,STR,GEN,NAL	Negativo
	S. Rissen	STR,CIP,NAL,NIT	<i>bla</i> VIM
	S. Cerro	IPM,NIT	<i>bla</i> VIM

AMP= ampicilina, CHL=clorafenicol, TCY= tetraciclina, FOX,= cefoxitina, CAZ= ceftazidima, STR=estreptomicina, CIP= ciprofloxacina, GEN= gentamicina, IPM=Imipenem, NAL= acido nalidixico, SXT= sulfametrozal-trimetoprim, NIT= nitrofurantoina. I: Intermediário.

Na tabela 3, estão os sorovares prevalentes de acordo com os anos de estudo.

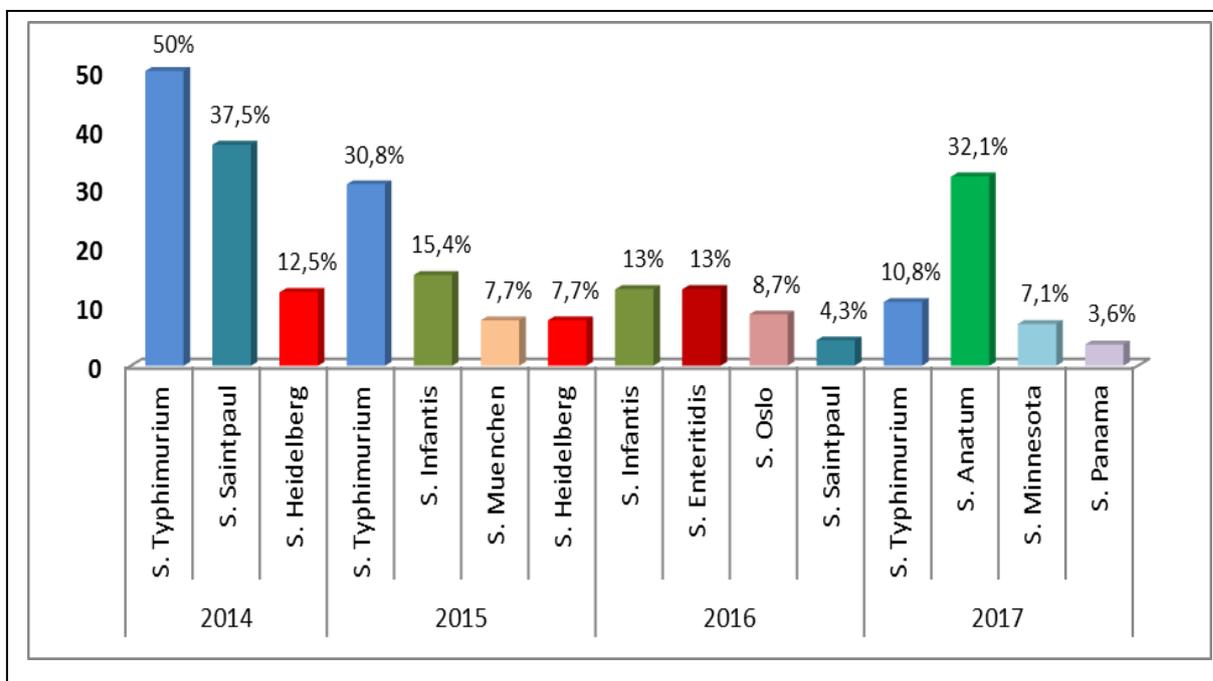


Gráfico 3: Distribuição percentual dos sorovares de Salmonella de acordo com os anos de estudo.

No geral os sorovares prevalentes entre 2014 a 2017 foram: S. Typhimurium, S. Anatum, S. Saintpaul, S. Infantis, S. Heidelberg, S. Enteritidis.

Em relação aos resultados da resistência das cepas de *Salmonella* foram os seguintes, conforme o gráfico 4:

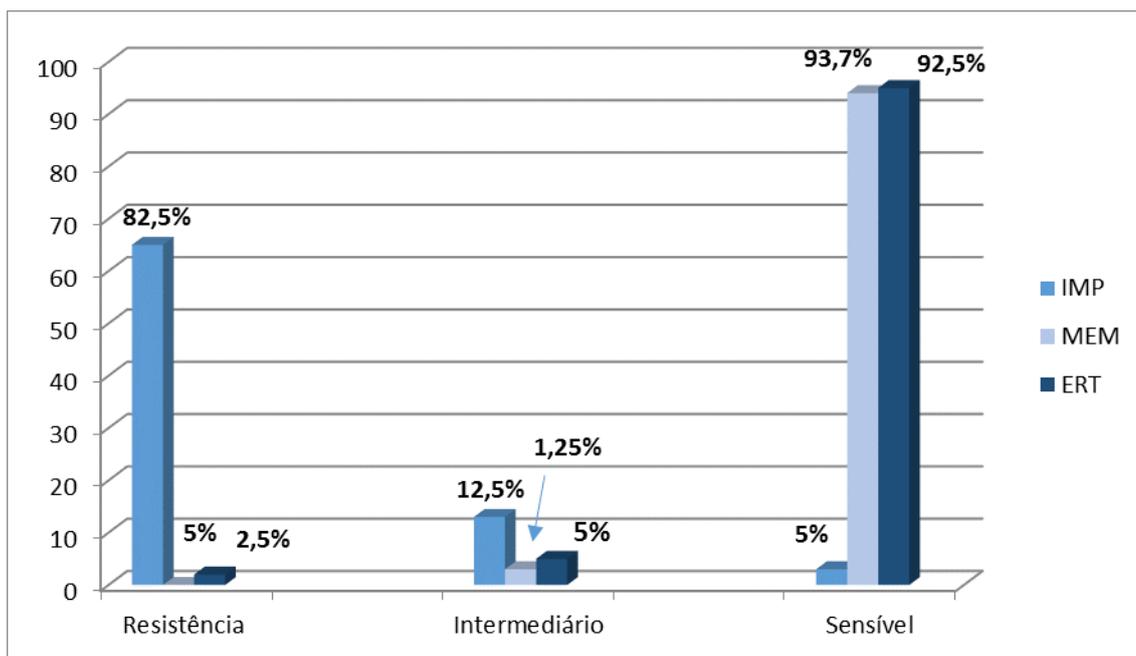
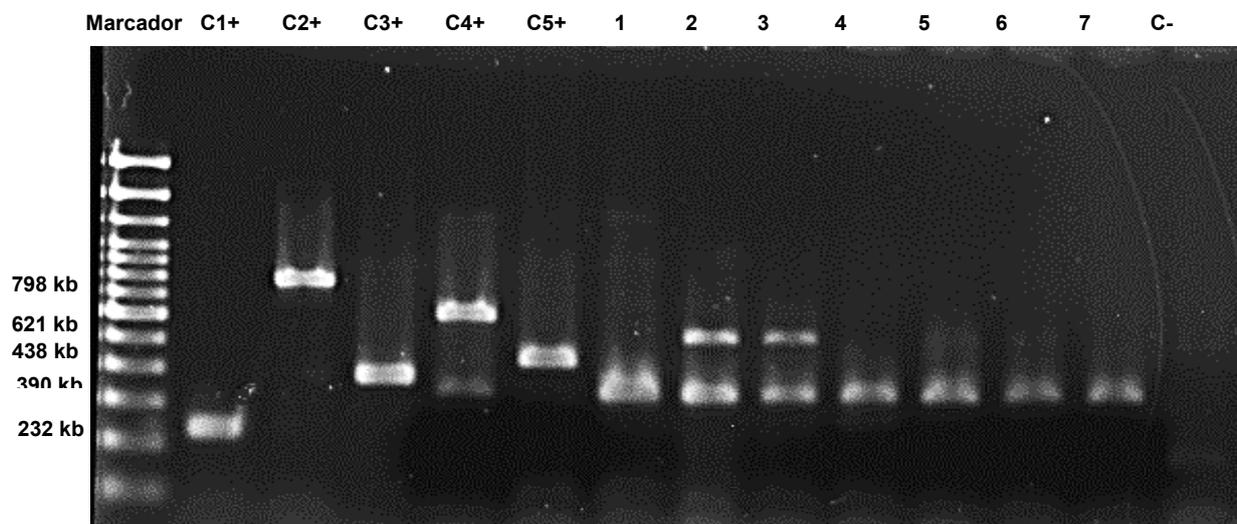


Gráfico 4: Avaliação em porcentual do Perfil de suscetibilidade aos Carbapenens por MIC, detectados em *Salmonella* spp. caracterizado no período de 2014 a 2017.

Os resultados apontaram 82,5% de resistência ao imipenem, 5% para meropenem e 2,5% para ertapenem. 12,5% das amostras representam perfil intermediário para imipenem, 1,25% para meropenem e 5% para ertapenem. Na avaliação quanto à concentração mínima inibitória ressalta-se que uma cepa apresentou resistência às três drogas testadas.



L – Letter; Controles +: C1+=IMP; C2+=VIM; C3+=OXA-48; C4+= NDM; C5+= KPC;

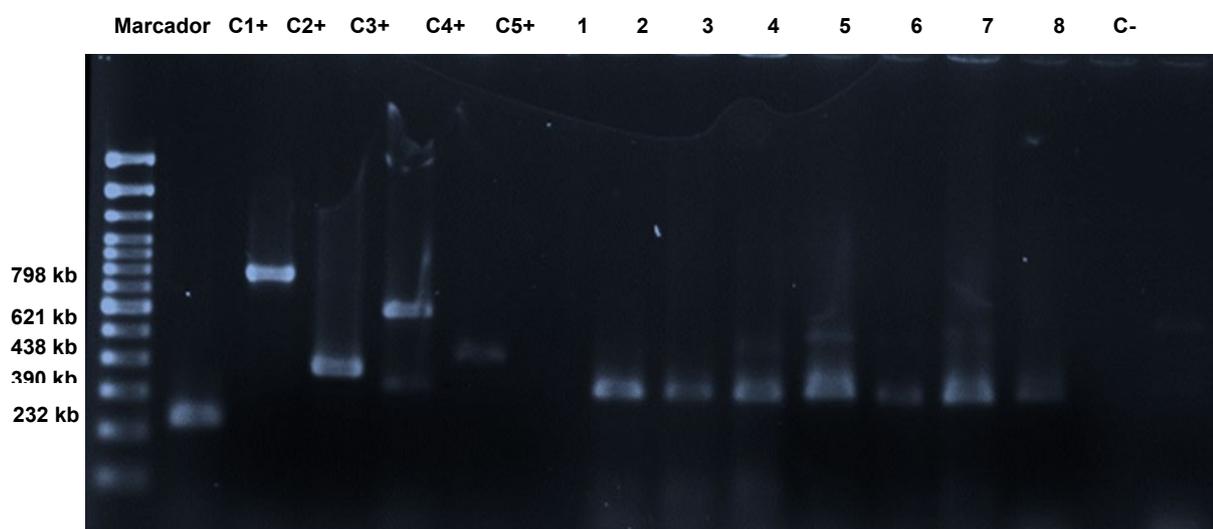
Controles positivos: C1+: *bla*IMP; C2+: *bla*KPC; C3+: *bla*VIM; C4+: *bla*NDM; C5+: *bla*OXA48

Reações Positivas: 1- IOC 2881/2014(*bla*VIM); 2- IOC2981/2015 (*bla*VIM e *bla*OXA48); 3-IOC6576/2015 (*bla*VIM e *bla*OXA48); 4- IOC6962/2015 (*bla*VIM); 5- IOC5786/2015 (*bla*vim); 6 - IOC112/2016 (*bla*VIM); 7- IOC116/2016 (*bla*VIM)

Controle negativo: Branco

Figura 10: Produto da amplificação dos genes de resistência para Carbapenems obtidos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella spp.*

Na figura 10 demonstra as cepas que foram positivas para os genes *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* e *bla_{OXA-48}* confirmando o resultado para a *Salmonella*.



Controles positivos: C1+: *bla_{IMP}*; C2+: *bla_{KPC}*; C3+: *bla_{VIM}*; C4+: *bla_{NDM}*; C5+: *bla_{OXA48}*

Reações Positivas: 2- IOC 5749/2016 (*bla_{VIM}*); 3- IOC6749/2016 (*bla_{VIM}*); 4-IOC6760/2016 (*bla_{VIM}*); 5- IOC6976/2016 (*bla_{VIM}*); 6- IOC6977/2016 (*bla_{VIM}*); 7 – IOC6988/2016 (*bla_{VIM}*); 8- IOC6991/2016 (*bla_{VIM}*)

Reação Negativa: 1 – IOC 3371/2016

Controle negativo: Branco

Figura 11: Produto da amplificação dos genes de resistência para Carbapenems obtidos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em *Salmonella spp.*

Na figura 11 estão representados mais exemplos dos genes que foram positivos para *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* e *bla_{OXA-48}*.

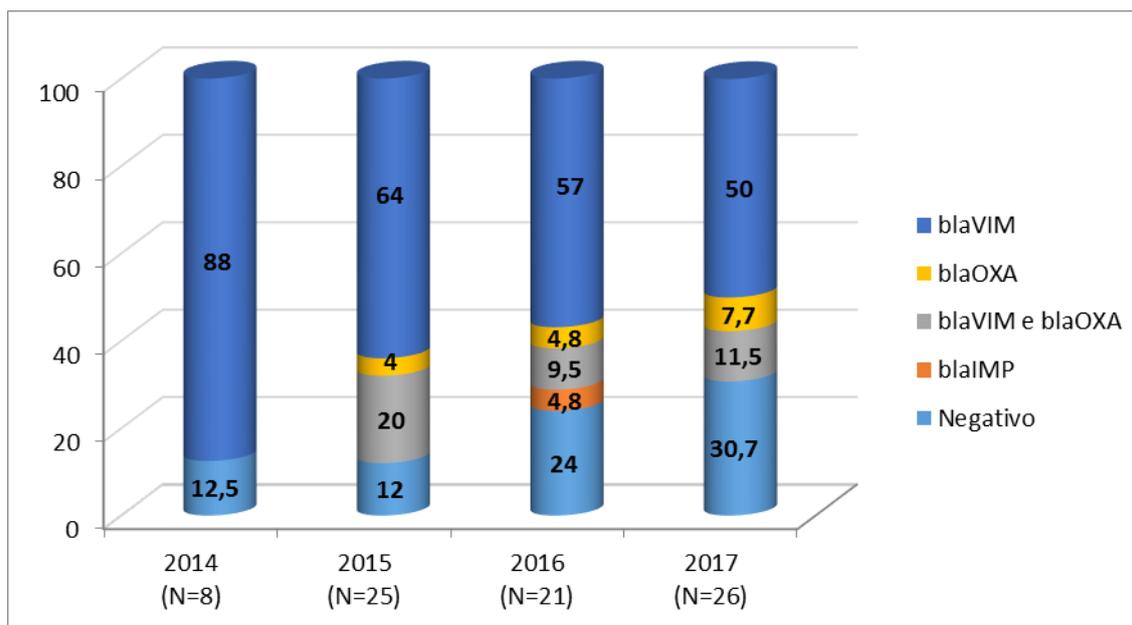
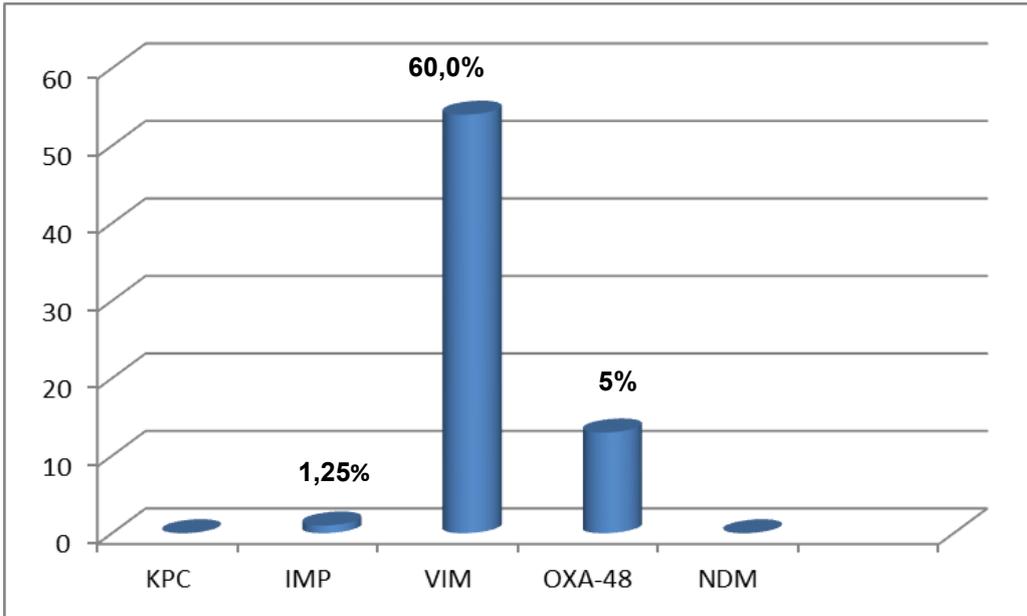


Gráfico 5 : Percentual de genes de resistência aos carbapenems detectados em *Salmonella*, distribuídas de acordo com o ano.

Tabela 4: Resumo do gráfico acima e seus valores correspondentes:

%	Negativo	blaIMP	blaVIM e blaOXA	blaOXA	blaVIM	Total
2014 (N=8)	12,5	0	0	0	88	100
2015 (N=25)	12	0	20	4	64	100
2016 (N=21)	23,8	4,8	9,5	4,8	57,14	100,1
2017 (N=26)	30,7	0	11,53	7,7	50,0	99,9

No gráfico acima, mostra os genes separados, especificando suas diferenças e seus valores, conforme os anos estudados.



*bla*_{KPC}, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases), *bla*_{IMP} (Imipenemase),
*bla*_{VIM} (Verona integron–encoded metallo-β-lactamase), *bla*_{NDM} (New Delhi metallo-β-lactamase)
*bla*_{OXA-48} (oxacillin-hydrolyzing).

VIM e OXA-48 = 12,5%

Cepas negativas = 21,25%

KPC e NDM = 0

Gráfico 6: Percentual geral de genes de resistência aos carbapenems detectados em *Salmonella* spp.

O gráfico acima, significa os genes nos anos de estudos, e a prevalência do *bla*_{VIM} nas cepas de *Salmonella* spp.

Na figura 12: Observa-se a relação das cepas de *Salmonella* que apresentaram produtos de amplificação para mais de um gene.

Especificando seu numeral e percentual encontrado nas cepas.

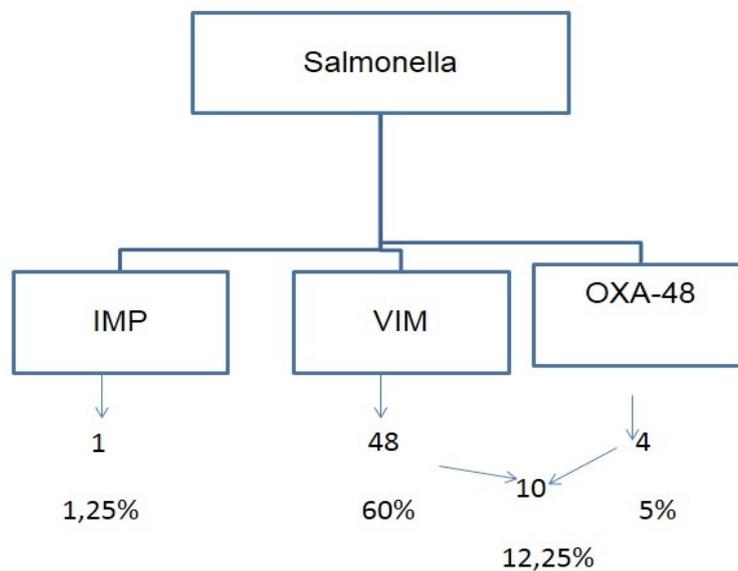


Figura 12: Esquema de amplificação de genes de *Salmonella* e seus percentuais.

10 – DISCUSSÃO

Os afluentes de esgoto e águas superficiais próximas são rotineiramente contaminados com microorganismos com genótipos clinicamente importantes, incluindo aqueles que produzem carbapenemases, fato que representa uma preocupação para a saúde pública e a sanidade animal, porque a introdução destes em populações de animais criados para produção de carne e derivados ou produção de alimentos onde pode levar à sua amplificação e disseminação por alimentos.

Quando paramos para pensar sobre a estrutura de saneamento do Brasil, dados do IBGE (2018) nos informam que no Brasil, dos 52,2% dos municípios que tem esgotamento sanitário, 32,0% tem serviço de coleta e 20,2% coletam e tratam o esgoto. A região Sudeste é a que apresenta maior porcentagem de municípios com rede de esgoto, sendo São Paulo o único estado com 100% dos municípios contemplados. No Rio de Janeiro este percentual é de 92%. Na região sudeste encontrada a maior porcentagem de municípios com tratamento de esgoto coletado, 48%. Quando pensamos e temos ciência de que os principais receptores do esgoto in natura não coletado são os rios e mares, este perfil compromete a qualidade da água utilizada para abastecimento, irrigação e recreação.

Os Carbapenêmicos tem sido considerada terapia de escolha pelo seu amplo aspecto de ação, pela sua estabilidade por serem fármacos bem tolerados por pacientes e por ter poucos efeitos adversos. As carbapenemases são enzimas capazes de hidrolisar todos os β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, aztreonam, carbapenêmicos) esta mais diversificada e largamente utilizada. Esta é reforçada pela dificuldade no uso de aminoglicosídeos e fluoroquinolonas os quais tem muitas vezes, sensibilidade diminuída, deixando a opção de tratamento bastante reduzida (Hirsch; T., 2010; Arend, 2014; Martinez-Martinez, González-Lopes, 2014).

Ainda que o imipenem e meropenem possuam o mesmo mecanismo de ação, algumas diferenças em sua ação *in vitro* e mecanismos de resistência, podem impactar diretamente na resposta clínica em infecções por Gram-negativos. Assim os estudos foram realizados com base em drogas utilizadas na clínica e com bons resultados.

O uso terapêutico dos carbapenêmicos foi seguido pelo surgimento e disseminação de enterobactérias produtoras de carbapenemases clinicamente relevante. Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e as cefalosporinas de espectro estendido no nível superior de sua nova lista de “patógenos prioritários” de bactérias resistentes para as quais são necessárias pesquisas sobre novas terapias. O Centro de Controle de Doenças-CDC, relatam aproximadamente 9.000 infecções anualmente nos EUA, por enterobactérias produtoras de carbapenemases. Nos EUA a taxa de mortalidade estimada em alguns estabelecimentos de saúde é em torno de 50% em pacientes de alto risco.

O gene *bla*_{KPC} e outros que expressam resistência para carbapenemases, incluindo as metalo- β -lactamases, migraram para fora do ambiente de saúde, sendo recuperadas de infecções humanas adquiridas em hospitais e na comunidade em várias espécies bacterianas. Obviamente, bactérias produtoras de carbapenemases podem se disseminar dos estabelecimentos de saúde para águas residuais e superficiais, além de animais e ambiente com implicações para a saúde pública.

Amostras de efluentes de uma estação de tratamento de esgoto assim como águas superficiais apresentaram uma mistura diversificada de espécies bacterianas produtoras de carbapenemases, genótipos de resistência aos carbapenems e tipos de replicon plasmidial.

É esperado que a maioria desses isolados tivesse resistência intrínseca aos carbapenems, a qual frequentemente encontrada em ambientes de solo e água. Essas bactérias produtoras de carbapenemases não são epidemiologicamente relevantes porque raramente produzem infecções humanas e porque geralmente não mobilizam elementos genéticos que codificam carbapenemases.

Entretanto quando avaliamos a amostragem por nós analisada as quarenta cepas de *E. coli* confirmaram resultados previamente obtidos, tendo fenotipicamente perfil de resistência aos antibióticos dos grupos dos carbapenêmicos, altamente relevantes clinicamente, relatados com frequência crescente, causando infecções nosocomiais frequentemente associadas a resultados negativos do paciente. Entretanto é importante ressaltar que de sua totalidade elevada percentual corresponde a isolados de fonte humana, ao longo dos quatro anos de estudo.

A disseminação de bactérias resistentes a antibióticos clinicamente relevantes, no meio ambiente, representa uma ameaça direta à saúde pública como um potencial reservatório para infecções adquiridas na comunidade.

Além disso, a disseminação ambiental descontrolada inevitavelmente leva à introdução de carbapenemases em populações de animais de produção onde podem ameaçar a saúde animal e a produtividade agrícola. Com a aplicação frequente de antibióticos em animais, pode resultar nos suprimentos de alimentos como produtos à base de carne fresca. Enterobactérias resistentes aos antibióticos são importante fonte de contaminação desses produtos à base de carne fresca de varejo, cujo potencial de expansão em carne bovina facilita a transmissão por alimentos.

O primeiro antimicrobiano da classe dos carbapenêmicos descoberto foi o imipenem que apresenta uma estrutura de amidina derivada da tianomicina com substituições do grupo metila para aumentar a ação bactericida e fornecer estabilidade contra as enzimas *bla*.

Os antibióticos, tanto sintéticos ou naturais emergiram como uma ferramenta para a neutralização de doenças infecciosas.

Estes são a terapia de escolha pelo amplo espectro de ação, estabilidade por serem fármacos bem tolerados por pacientes e por ter pouco efeito adverso. Porém é preocupante a forma como esses medicamentos são utilizados em ambientes ambulatoriais, hospitalares e domésticos no tratamento ou profilaxia de doenças humanas.

Na totalidade das *E. coli* foram 40 cepas, os resultados apontaram resistência para uma ou mais drogas, incluindo à classe dos carbapenêmicos, cujos listados na tabela correspondente.

A utilização dos antimicrobianos com fins veterinário e de produção pecuária, da mesma forma que na medicina humana, está diretamente vinculada com a liberação dessas substâncias em meio ambiente. Esta se dá através de esgoto sanitário, efluentes hospitalares e industriais, o pouco caso dos medicamentos com prazo de validade expirado e sobras domésticas daqueles não utilizados (Acurcio, et al. 2013) os quais selecionam bactérias resistentes no meio ambiente, principalmente no esgoto.

E ainda existe um antibiótico polipeptídico que é a colistina, que tem atividade bactericida contra infecção para Gram negativo, consiste de *colistina A* e *B*. Esta pertence a um grupo de agentes antimicrobianos conhecidos como polimixinas, que foram isolados originalmente do organismo do solo formador de esporos *Paenibacillus polymyxa*. (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System, 2018).

Existe um relato de resistência à colistina mediada por plasmídeo na China designada como gene *mcr-1* (Yi-Yun, Liu et al., 2016) que também é relatada de perto em cinco continentes: Ásia, Europa, África, América do Norte e América do Sul (Schwarz e Johnson, 2016).

No Brasil, em 2016, um grupo de pesquisa identificou pela primeira vez a presença do gene *mcr-1* em animais de produção das regiões Sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e Sul (Paraná e Santa Catarina), o que deve ser considerado uma urgência epidemiológica e um alerta para as implicações no agronegócio, visto que o país é um grande produtor e exportador de produtos de origem animal. (Fernandes et al, 2016).

O antibiótico entrou em uso na década de 1960 e foi banido por muitos anos devido ao efeito nefrotóxico e neurotóxico, foi introduzido novamente para o uso contra bactérias multirresistentes, isoladamente ou em combinação com outras drogas. Representa a última opção tendo em vista que seu uso em dose controlada, a colistina pode ainda causar nefrotoxicidade.

Sendo um gene mediado por plasmídeo que confere resistência à colistina, *mcr-1*, foi relatado pela primeira vez no final de 2015 em isolados de *E. coli* de animais de produção e sua carne coletada na China durante 2011–2014. Embora a colistina tenha sido amplamente utilizada em animais produtores de alimentos em todo o mundo por muitos anos, não era disponível para uso clínico humano na China até 2017, sugerindo que a pressão de seleção para a disseminação de *mcr-1* foi impulsionada pelo uso veterinário de colistina.

Logo após esta primeira descrição, viu-se o gene *mcr-1* se disseminou globalmente em *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* e *Salmonella* spp. isolados de origem animal, ambiental e humana. A disseminação global da *mcr-1* provavelmente também foi facilitada pela viagem humana, como sugerida pelo achado do gene em bactérias entéricas de viajantes retornando à Europa após visitarem países com alta prevalência de *mcr-1* na América do Sul, Ásia e África.

É mais frequentemente observada em Enterobacteriaceae portadora do gene *mcr-1* juntamente com o gene resistente a carbapenemases. (Alhashem, F. et al, 2017). Organizações internacionais de padronização, como o CLSI e o Comitê Europeu para Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST) formaram um grupo de trabalho de quebra de polimixina em março de 2016, que recomendou apenas microdiluição em caldo para testar a suscetibilidade à colistina.

Teste genotípico é aconselhável para detectar o gene *mcr* como existem disponíveis e/ou comercializados para detecção de resistência a colistina incluindo uma reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para a pesquisa de *mcr-1* a *mcr-5*. No presente estudo o percentual de 2,5% foi detectado para o gene *mcr-1*.

Embora a existência de carbapenemases seja conhecida há mais de 20 anos, sua origem ou provável papel fisiológico ainda não são conhecidos. O IMP foi a primeira carbapenemase e o primeiro MBL (metallo- β -lactamase) a ser detectado em 1991 no Japão (Watanabe et al. 1991), enquanto o VIM foi descoberto mais tarde em 1997 em Verona, Itália (Lauretti et al. 1999).

As enzimas do tipo IMP e VIM se espalharam com sucesso para todos os continentes desde então (Walsh et al., 2005). Em contraste com a NDM, que apresentou uma expansão global espetacular desde sua detecção em 2008 na Índia (Yong et al., 2009), o mesmo não foi encontrado no presente estudo. Microrganismos produtores de NDM foram isolados com alta prevalência em instalações de saúde e nichos ambientais no subcontinente indiano e disseminados por meio de transferência de pacientes ou viajantes colonizados na Europa, América do Norte, Extremo Oriente e Austrália (Dortet et al., 2014).

É preocupante que um segundo epicentro provável pareça estar localizado nos Bálcãs centrais sem qualquer conexão óbvia com a Índia (Meletis et al., 2014a). Nove cepas portadoras do gene *bla*_{IMP} foram detectadas de *E. coli* avaliadas, 23% do quantitativo do estudo.

A primeira enzima *bla*_{IMP} foi descoberta em 1991 no Japão em *P. aeruginosa* e durante muitos anos ficou restrita apenas àquele país. Atualmente, a IMP tem sido encontrada em diversos países, em diferentes espécies bacterianas, como *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, com 26 variantes pertencentes à subclasse *bla*_{IMP} descritas até o momento (Osano et al., 1994, Danel, et al., 1999, Carrer, et al., 2010).

A presença do gene *bla*_{KPC} foi detectada em 8% das cepas de *E. coli*, (Nordmann et al., 2012), reconhecida sua disseminação mais rápida e geograficamente estendida.

Encontrado pela primeira vez no final dos anos 90 na área da cidade de Nova York nos EUA (Yigit et al. 2001), ele logo se espalhou para estados vizinhos, em seguida para América Latina (Villegas et al. 2006) e Israel (Leavitt et al. 2010).

As carbapenemases apresentaram rápida disseminação após sua identificação e descrição iniciais, sendo que o subtipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) destacou-se entre 2001 e 2003, registro dos primeiros isolados. A seguir eles provavelmente entraram em países vizinhos e através da Grécia para o resto da Europa, onde sua prevalência é alta nos países do sul, e baixos nos países do norte. Ainda significativo e sua prevalência em diferentes regiões da China, embora não esgotam dados suficientes para avaliar sua real disseminação naquele país (Tzouveleki et al, 2012).

No Brasil, KPC foi encontrada em isolados de São Paulo, Recife, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul a partir de 2009, disseminando-se por todo país a partir de 2010. (Scherer et al., 2017).

Os principais focos de bactérias produtoras de OXA-48 são descritos de ocorrências no Oriente Médio (Carrère et al. 2010) e norte da África (Cuzon et al., 2010). Em sequência são descritos isolamentos na Europa (Potron et al., 2011), Turquia , Índia (Castanheira et al., 2014), Senegal (Moquet et al., 2011) e Argentina, fortalecendo a disseminação global para este tipo de carbapenemase. Os resultados obtidos apontaram 5% nas cepas analisadas. Sequencialmente, o subtipo OXA-48 (Oxa-carbapenemase) foi identificado em *K. pneumoniae* e *E. coli* na Europa e Oriente Médio. No Brasil, foram identificados na cidade de Porto Alegre em 2013. Estes subtipos estão associados a casos de infecção e colonização, ambos com desfechos clínicos desfavoráveis.

O gene *bla*_{OXA-48} em 1985 foi detectado em *K. pneumoniae* e *E. coli*, mas também pode ser encontrado em outras Enterobacteriaceae, como *Enterobacter* e a *A. baumannii* na Escócia (Bharway et al, 2015). Em contraste com outras carbapenemases, o *bla*_{OXA-48} não é ativo contra as cefalosporinas de amplo espectro, e hidrolisa os carbapenêmicos apenas fracamente.

Geralmente está localizado em transposons tipo Tn 1999 , transportados por plasmídeos auto-transferíveis de cerca de 60 kb pertencentes ao grupo de incompatibilidade IncL/M, responsáveis por sua ampla disseminação entre membros da família Enterobacteriaceae.

Entre as cepas de *E. coli* avaliadas duas foram encontradas e apontaram somente o gene *bla*_{OXA-48} e outras duas apontaram a presença de *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA-48}.

A detecção de bactérias produtoras de mecanismos de resistência adquiridos como as ESBL, carbapenemases e *mcr-1* é uma questão importante para definição da terapia apropriada e, principalmente, para a implementação de medidas de controle de infecção. Entretanto a detecção dessas bactérias com genes de resistência só é realizada quando estas já exibem resistência nos testes de sensibilidade ao antimicrobiano, pois os testes fenotípicos são baseados nas resistências aos antimicrobianos e os testes moleculares têm elevado custo (Hammoudi, et al, 2014).

No Brasil, o primeiro relato do plasmídeo contendo *mcr-1* foi identificado em *E. coli* (Fernandes et al., 2016).

Na totalidade das *E. coli* foram 40 cepas, os resultados apontaram cepas de resistência para uma ou mais drogas, incluindo à classe dos carbapenems.

Quanto aos microrganismos envolvidos, estudos na Europa revelam maior incidência e casos de OXA-48. No Reino Unido alerta para dispersão e diversidade em Enterobacteriaceae para OXA-48 principalmente para *K. pneumoniae*, provavelmente tendo a proximidade das regiões do Mediterrâneo e Norteafricanos (Scherer et al, 2017). No presente estudo comprovou-se que 15 cepas apresentaram os genes IMP, KPC e OXA-48 para *E. coli*, sendo de fontes humana, alimentar e animal. Sendo duas cepas com resistência as três drogas sendo a 02/14 dando o gene *bla*_{KPC} e *bla*_{IMP} do estado da Bahia e a 277/17 de *bla*_{KPC} de Goiás sendo as duas de fonte humanas.

No total do estudo de 40 cepas dos quatro anos (2014 a 2017) todas deram intermediárias e/ou resistente para uma das drogas das amostras testadas. A cepa 34/2017 deu colistina positiva e o gene *mcr-1* positivo. Todas as cepas foram submetidas ao PCR, porém o gene *bla*_{VIM} e *bla*_{NDM} não foram detectados.

Os resultados para *Salmonella*, os sorogrupos mais prevalentes foram: S.Typhimurium, (18,8%) S. Anatum, (10,5%) S. Infantis (9,4%), S. Heidelberg (4,7%) S. Enteritidis (3,5%), entre outros em menor quantidades como: S. Heidelberg, S. Minnesota, S. Muenchen, S. Newport, S. Saintpaul, nos quatro anos. Assim os sorovares que predominaram ao longo dos anos estudados foram S. Typhimurium,

S. Infantis, S. Anatum, S. Enteritidis, S. Saintpaul, entre outros em pouca quantidade como: S. Heidelberg, S. Minnesota, S. Muenchen, S. Newport, etc.

Em relação a *Salmonella* teve 82,5% de resistência a imipenem, 5% para meropenem, 2,5% para Ertapenem, 12,5% para intermediário para imipenem, 1,25% para meropenem e 5% intermediário para ertapenem. Houve uma cepa que foi resistente para as três drogas testadas (1434/2017- MIC)

Quando esses sorotipos específicos causam doenças em humanos, muitas vezes são invasivos e podem ser fatais. A maioria dos sorotipos, no entanto, está presente em uma ampla gama de hospedeiros. Tipicamente, causam gastroenterite, que é frequentemente descomplicada e não necessita de tratamento, mas a doença pode ser grave em jovens, idosos e pacientes com imunidade enfraquecida. Esse grupo apresenta *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, os dois sorotipos mais importantes de *Salmonella* transmitida de animais para humanos na maior parte do mundo. (<https://www.who.int>. 2018.)

Na União Europeia, a vigilância da resistência aos carbapenem (meropenem, ertapenem e imipenem) e da presumível *Salmonella* e *E.coli* produtoras de carbapenemases provenientes de animais *destinados* à alimentação humana e seus alimentos derivados nos diferentes Estados-Membros está incluída na Legislação.

Ainda pela a difusão em discos (TSA) os resultados apontaram resistência ao Imipenem de 45% e a Meropenem de 33,7 e para o Intermediário foi de 22,5% para IMP e 6,3 a MEM e com a sensibilidade a 1,3% de IMP e 62,5% a MEM, não houve este teste para o Ertapenem.

Em relação aos genes de *Salmonella* em 80 cepas estudadas a predominância do *bla*_{VIM} foi de 60 %, o *bla*_{OXA-48} foi de 5% e *bla*_{IMP} de 1,25%. E os dois genes *bla*_{VIM} e *bla*_{OXA-48} juntos foram de 12,5%. Não houve os outros genes estudados, como o *bla*_{KPC} e o *bla*_{NDM}.

A enzima *bla*_{VIM} foi descrita em Verona na Itália a partir de uma cepa de *P. aeruginosa* isolada em 1997. Porém antes de 1996 o VIM-2 foi isolado na França em *P. aeruginosa*. No Brasil também foi identificada na mesma bactéria. A *P. aeruginosa* conforme os anos passaram foram identificados o IMP e NDM como genes. No estudo foi encontrado uma cepa de *bla*_{IMP} e o *bla*_{OXA-48} foram encontrados

16,25% para esse gene. Estudos na Europa revelaram maior incidência de *bla*_{OXA-48}, fato semelhante aquele encontrado no Reino Unido alerta-se para a dispersão e diversidade em *Enterobacteriaceae* para a OXA-48. (Scherer et al., 2017)

No geral das cepas os resultados apontaram resistência para uma ou mais drogas, incluindo à classe dos carbapenems.

Quanto à caracterização do perfil molecular, as análises foram feitas e encontrados os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA48} em cepas de *E.coli*. Em *Salmonella* foram encontrados os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{Oxa-48} na maioria das cepas.

Comparando com o estudo o *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC} e *bla*_{OXA-48} como resultado para *E. coli* e para *Salmonella* prevaleceu o gene *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e o *bla*_{IMP}.

No computo geral os genes que predominaram foram *bla*_{IMP} (22,5%) para *E. coli* e *bla*_{VIM} (60 %) para *Salmonella*. Finalizando os totais do estudo foram: 12,5% para *bla*_{IMP}, 3,75% para *bla*_{KPC}, 14,16% para *bla*_{OXA-48} e com mais predominância 60% de *bla*_{VIM}. Ressaltando-se que 2,5% foi para dois genes juntos o *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA-48} e ainda o *bla*_{VIM} e o *bla*_{OXA-48} com 11,25% para as duas bactérias.

11 - CONCLUSÕES

Todas as *E. coli* e *Salmonella* spp. foram selecionadas confirmaram perfil de suscetibilidade pelo teste de difusão em discos (TSA) ou pela concentração mínima inibitória (MIC) nas drogas avaliadas.

E. coli as 40 cepas avaliadas confirmando que 30% tem o perfil de resistência para imipenem, 35% para meropenem e 10% para ertapenem.

Conseqüentemente foi avaliada a susceptibilidade a colistina através do MIC, dando 37% resistente, sendo o ano 2016 com maior prevalência em todos os anos do estudo.

Através da PCR foram os genes de resistência *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{NDM}, com o resultado de *bla*_{IMP} 22,5%, *bla*_{KPC} 7,5% e *bla*_{OXA-48} de 5%, sendo as cepas que foram resistentes a colistina apresentaram 2,5% do gene *mcr-1*.

Este gene *mcr-1* aparece em uma cepa no ano 2017 (34/17). Totalizando no geral 37,5% foram positivas para os genes testados de *E. coli* e 62,5% não apresentaram os genes. Não foi detectado o gene *bla*_{NDM}.

Para *Salmonella* foram 80 cepas testadas para a resistência aos carbapenêmicos.

Os sorovares prevalentes foram: *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Infantis*, *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis*, *S. Saintpaul* dos quatros anos avaliados.

Os resultados da resistência e da sensibilidade reduzida foram confirmados pelo TSA e pelo MIC. Sendo 82,5% de imipenem, 5% de meropenem e 2,5% de ertapenem.

Para os genes de *Salmonella* a predominância foi do gene *bla*_{VIM} de 60%, *bla*_{OXA-48} foi de 5% e do *bla*_{IMP} de 1,25%. Ainda com os dois genes *bla*_{VIM} e *bla*_{OXA-48} foram de 12,5%.

Não houve os outros genes estudados para *Salmonella* como o *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC}.

E. coli foram o *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA-48}. *Salmonella* foram encontrados o *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA-48}.

O gene *bla*_{NDM} não se confirmou para nenhuma das 120 cepas avaliadas e o gene *bla*_{KPC} somente para *E. coli*.

Esta assertiva indica que carbapenemases clinicamente relevantes, atualmente contaminam efluentes de esgoto tratado e águas superficiais. Isto sinaliza uma clara necessidade de esforços de mediação para remover ou reduzir a ameaça à saúde pública representada por essas cepas bacterianas altamente resistentes. Deve-se tomar cuidado para garantir que impactos negativos ao meio ambiente sejam minimizados. Pesquisas adicionais provavelmente são necessárias para identificar os pontos e metodologias de intervenção mais eficazes para reduzir à disseminação a expansão ambiental de microorganismos portadores de genes de resistência.

Portanto, até que uma alternativa confiável aos carbapenêmicos seja encontrada ou a presença de carbapenemases efetivamente superada, a racionalização do uso de antibióticos em humanos e animais, a aplicação de medidas rigorosas de controle de infecção sempre que a resistência a carbapenêmicos seja detectada e a vigilância ativa da presença de codificação carbapenemase os genes são da maior importância.

12 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abatcha, M.G. Zakaria, Z. Kaur, D.G. Thong, K. L. (2014). Review Article: A trends of *Salmonella* and antibiotic resistance. *Advances in Life Science and Technology* vol. 17, p. 9-21.

Abrantes, J.A., Nogueira, J.M.R. (2017). Utilização de testes fenotípicos para pesquisa de carbapenemases em Enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. *Brazilian Journal of Clinical Analyses*. v. 49 n° 3.

Ajiboye, R.M., Solberg, O.D., Lee, B.M., Raphael, E. DebRoy, C., Riley, L.W. (2009). Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. *Clin Infect Dis*; 49: 365-71.

Alekshun, M.N., Levy, S.B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Elsevier Inc.* Volume 128, Issue 6, 23, Pages 1037-1050. <https://doi.org/10.1016/j>.

Alhashem, F. Tiren-Verbeet, N.L. Alp, E., Doganay, M. (2017). Treatment of sepsis: What is the antibiotic choice in bacteremia due to carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*? *World J Clin Cases*. Aug 16; 5(8): 324–332.

Alves, A. P., Behar, P. R. P. (2013). Infecções hospitalares por Enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. *Revista da AMRIGS*, v. 57, n. 3, p. 213-218.

ANVISA – (2016) - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Atualização do comunicado de risco nº002/2013 - GVIMS/GGTES - ANVISA, que trata da circulação de micro-organismos com mecanismo de resistência denominado "New Delhi Metalobetalactamase" ou NDM em diferentes regiões do Brasil. Comunicado de risco nº003/2013 - GVIMS/GGTES. Brasília, 2013a. Disponível em: <http://www.riscobiologico.org/lista/20130912_04.pdf>. Acesso em 28 Dez. 2016.

ANVISA – (2016) - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim informativo da rede nacional de monitoramento da resistência microbiana em serviços de saúde – rede RM: resistência microbiana em IPCSL relacionada a CVC em UTI (2012). Ano IV Edição nº 7. Brasília, 2014. Disponível em: Acesso em: 19 Out. 2016.

ANVISA – (2016) - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Nota técnica nº01/2013. Brasília, 2013b. Disponível em: Acesso em: 9 Jan 2017.

Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças Infecciosas dos animais. *Revista Científica de Medicina Veterinária* - Issn:1679-7353 Ano XIV número 26 – Janeiro de – Periódico Semestral.

Arend, L. N. V. S. Caracterização molecular, fenotípica e epidemiológica de micro-organismos produtores de carbapenemase KPC isolados no Estado do Paraná.

2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

Arnold, R.S., Thom, K.A., Sharma, S., Phillips, M., Johnson, J.K., Morgan, D.J. (2011). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) -producing bacteria. *South Med J*; 104(1): 40–45.

Barnes, H. J., Vaillancout, J. P., Gross, W. B. (2008) Colibacillosis. In: Atheneu SP – 55 – 60 páginas.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2015). Book Review *Int. J. of Syst. Bact.*; July, p. 408.

Bhardwaj, M. (2015). Emergence of herbal antimicrobial drug resistance in clinical bacterial isolates. *Pharm Anal Acta* 6: 434. doi:10.4172/21532435.1000434.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). (2007). Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico. Brasília, Disponível em: Acesso em: 26 jun. 2018.

Brasil. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – (2014) SNSA. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – Brasília: SNSA/MCIDADES, 181 p.

Bush, K., Fisher, J.F. (2011). Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 65:455–78.

Caffer, M.I., Terragno, R. (2001). Manual de procedimientos para la caracterización de Salmonella. Ministerio de Salud. Subsecretaría de Investigación y Tecnología- ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”- Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (Departamento Bacteriología – Serviço Enterobacterias, Buenos Aires, Argentina.

Carrër, A., Poirel, L., Yilmaz, M., Akan, O., Feriha, C., Cuzon, G. (2010) Propagação do plasmídeo codificador de OXA-48 na Turquia e além. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1369–1373.

Castanheira, M.; Mendes, R.; Cepparulo, M.; Gurler, N.; Flonta, M. Jones, R.N. (2014). Resistance surveillance program report for selected European nations. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Elsevier. v. 78 14 p. 429-436.

Castilla, K.S., Ferreira, C. S. A., Moreno, A.M. (2006). Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* and *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.37, n.2, p.135-139.

Cesco, M.A.O. (2010). Pesquisa de fatores associados à virulência de *Salmonella* Hadar através da reação em cadeia da polimerase (PCR) <http://hdl.handle.net/10183/22997>.

CDC. 2012 CRE toolkit: guidance for control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; <http://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/cre-toolkit>.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Salmonella surveillance: annual summary, 2008. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2004. Disponível em: Acesso: agosto, 2019.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Salmonella surveillance: outbreaks involving Salmonella, 2012. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Service. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>> Acesso: agosto, 2019.

Clinical And Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 25th Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA, USA, 2015.

Grimont, P.A.D.; Weill, F.X. Antigenic formulae of the Salmonella Serovars. 9th ed. Paris: Institut Pasteur, 2007. WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella. Disponível em: Acesso em: setembro, 2019.

Chiou ,C. H., Hong, Y.H., Liao, Y.H. ,Wang,Y .W. , Hua, Tu, Y. Chen, B. H., Chen. Y.C. (2019). New Multidrug-Resistant *Salmonella enteric* Serovar Anatum Clone, Taiwan, 2015–2017. EID Journal ,Volume 25, Number 1.

Chiu, C. H., Su, L. H., Wang, M. H., Yeh, C. M., Weill, F. X. (2006). Detection of multidrug-resistant *Salmonella enteric* serovar Typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology. v. 44; p.2354–2358.

CLSI – Clinical and laboratory standards institute (2019). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty Seventh Informational Supplement. M100-29 th ed. <https://clsi.org>.

Coculesco, B.I. (2009). Antimicrobial resistance induced by genetic changes. J Med Life v. 2 n. 2, p. 114 – 23.

Cortez, A.L.L., Carvalho, A.C.F.B., Ikuno, A.A. (2006). Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. Arquivo do Instituto de Biologia, v.73, p.157-163.

Costa G. A., Hofer E. (1972). Isolamento e identificação de Enterobactérias. Monografia, Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 120 p.

Costanzo S.D. , Murby J., Bates J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. Elsevier; 51 (1-4): 218-23.

Cruz, L.P., Magarinos-Torres, R. Acurcio FA (org.) Medicamentos: políticas, Assistência Farmacêutica, Farmacoepidemiologia e Farmacoeconomia. 1.ed. Belo

Horizonte, 2013. Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde São Paulo v.6 n.1 41-42 jan./mar. 2015.

Cunha D.G.F., Grull D., Damato M., Blum J.R.C., Eiger S., Lutti J.E.I., (2011). Contiguous urban rivers should not be necessarily submitted to the same management plan: the case of Tietê and Pinheiros Rivers (São Paulo-Brazil). An. Acad. Bras. Cienc.; 83 (4): 1465-1479.

Cuzon, G., Naas, T., Truong, H., Villegas, M. G., Wisell, K.T., Carmeli, Y., Gales, A. C., Navon-Venezia, S., Quinn, J. P., Nordmann, P. (2010). Worldwide Diversity of *Klebsiella pneumoniae* That Produce β -Lactamase *bla*_{KPC-2} Gene Emerg Infect Dis. 2010 Sep; 16(9): 1349–1356. doi: 10.3201/eid1609.091389

Danel, F., Hall, L. M. C., Duke, B., Gur, D., Livermore, D. M., (1999). OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, v. 43, n. 6, p. 1362-6.

Davies, J.; Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews. v. 74, n. 3, p. 417-33.

Demir, Y., Zer, Y., Karaoglan, I. (2015). Investigation of VIM, IMP, NDM-1, KPC AND OXA-48 enzymes in Enterobacteriaceae strains. Pak. J. Pharm. Sci. May;28(3 Suppl):1127-33. http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf. > Acessado em junho 2019.

Dortet, L, Bréchard, L, Poirel, L, Nordmann, P. (2014). Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from blood cultures. Clin. Microbiol. Infect. Apr; 20(4):340-4. doi: 10.1111/1469-0691.12318.

Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae...
<https://www.microbiologyresearch.org/journal/ijsem>
1986 - Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York. 1

EUCAST - Clinical breakpoints and dosing of antibiotics
www.eucast.org > clinical breakpoints -8 de jan. de 2019 - Guidance from EUCAST (last edited 2016). In the 2019 .

Fernandes, M. R., McCulloch, J.A., Vianello, M. A., Moura, Q., Pérez-Chaparro, P.J., Esposito, F., Sartori, L., Dropa, M., Matté, M. H., Lira, D. P., Mamizuka, E. M., Lincopan, N. (2016). First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* ST101 isolated from a human infection in Brazil. Antimicrob Agents Chemother, 60(10): 6415-7.

Fernandez, J.; Guerra, B.; Rodicio, M.R.(2018). Resistance to carbapenems in non-typhoid serovars of *Salmonella* enteric from humans, animals and food. Veterinary Sciences, MDPI, 5(2):40.doi: 10.3390/vetsci5020040.

Forsshell, I. P., Wierup, M. (2006). *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Revue Scientific technology Off International Epizzootic*, v. 25, n. 2, p. 541-554.

Gautier, G. (2018). Detection of different classes of carbapenemases: Adaptation and assessment of a phenotypic method applied to *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, and proposal of a new algorithm. *Journal of Microbiological Methods* – v. 147, p. 26-35.

Germano, P.M.L.; Germano, M.I.S. (2008). .Agentes bacterianos de toxinfecções. In: *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*. Barueri, SP: Manole. p. 317-323.

Iedraitienė, A, Vitkauskienė, A, Naginienė, R, Pavilionis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *medicina (Kaunas)*; 47(3):137-46.

Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilionis A. (2011) ;Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*. 47(3):137-46.

Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (Glass). (2018). The detection and reporting of colistin resistance. Version 1. Genova: World Health Org.

Grimont, P. A. D.; Grimont, F.; Bouvet, P. (2000). Taxonomy of the genus *Salmonella*. In: *Salmonella in Domestic Animals*. Wray, C. ,Wray,A. Editora: Cabi Publishing, USA. p.1-17.

Grimont, P.A.D., Weill, F.X. (2007). Antigenic formulae of *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 9th edition. France: Institute Pasteur , 167 p.

Guenther, S, Ewers, C, Wieler, L.H. (2011). Extended-spectrum beta- lactamases producing *E.coli* in wild life, yet another form of environmental pollution? Review Article. *Fron.t Microbial*.

Guibourdenche, M., Roggentin. P., Mikoleit, M. , Fields, P. I. , Bockemühl, J., Grimont, P. A., Weil, I F.X., (2010). Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* 161(1):26-9. doi: 10.1016/j.resmic.2009.10.002. Epub. 2009 Oct 17.

Gupta, S., Govil, D., Kakar, P. N. (2009). Colistin and polymyxin B: a re-emergence. *Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, v. 13, n. 2, p. 49–53.

Haas, D.J., Torres, A.C.D. (2016). Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. *Rev. Científica de Medicina Veterinária*; ano XIV(26).

Hammoudi D., Moubareck, C. A., Sarkis, D. K. (2014). How to detect carbapenems producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. J. Microbial. Methods, v. 107, p. 106-18.

Hawkey, P.M, Jones, A. M. (2009). The changing epidemiology of resistance J. Antimicrob. Chemother; 64 (Suppl 1): i3–i10.

Hirsch, E. B.; Tam, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 65, n. 6, p. 1119-1125, 2010.

<https://foodsafetybrazil.org/surtos-por-salmonella-dados-estatisticos-sintomas-e-prevencoes/2015>. Acessado em: 25 de junho de 2019.

<https://www.who.int>. This group features *Salmonella enteric* serotype Enteritidis and *Salmonella enteric* serotype Typhimurium, the two most important, 20 February 2018.

Humphrey, T. J. (2000). Public-health aspects of *Salmonella* infection. In: *Salmonella* in Domestic animals. Wray, C. & Wray, A. (Eds.). Cabi Publishing, New York, USA, 463p. / p.245-263.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <HTTP://www.ibge.gov.br> Acessado em 07/11/2011. Disponível em 26 jun 2018.

INEA- Instituto Estadual de Meio Ambiente. Disponível em <HTTP://www.inea.rj.gov.br> Acessado em 15/02/2012. Publicado no DOE - RJ em 18 dez 2012. Disponível em: 26 jun. 2019.

Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., Pinna, E., Nair, S., Fields, P. I., Weill, F. (2014). Supplement 2008-2010 (n° 48) to the Whitekauffmann-Le Minor scheme, Recherche in Microbiology, v. 161, p. 26-29.

Jajere. S.M. (2019). A review of *Salmonella enteric* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. Veterinary World, 12(4): 504-521
Review (Published online: 06-04-2019)

Kohner, P., Uhl, J., Kolbert, C., Persing, D., Cockerill, F. (1999). A comparison of susceptibility testing methods with *mecA* Gene analysis for determining oxacilin (methicilin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus* spp. Journal of Clinical Microbiology, v.37, n.9, p.2952-296.

Kuhnert, P.; Boerlin, P.; Frey, J. (2000). Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. FEMS Microbiology Reviews, v.24, n.1, p.107-117.

Kümmerer, K., Henninger, A. (2003). Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Microbiologia Clínica e Infecção*. Dec; 9 (12):1203-14 DOI: 10.1111 / j.1469-0691.2003.00739.

Kümmerer, K., (2015). Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources—a review” *Elsevier Chemosphere* 45 (2011) 957–969.
Lancet Infect Dis 2016; 16: 161–68 <http://dx.doi.org/10.1016/>

Laurettil, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., Rossolini, G.M (1999). Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. Jul; 43(7):1584-90.

Lavagnoli, S.I., Bassetti, B. R., Kaiser, T.D. L., Kutz K. M., Cerutti, C. J. (2017). Factors associated with acquisition of carbapenems-resistant Enterobacteriaceae. *Rev. Latino-Am. Enfermagem Original Article*; 25: e 2935 DOI: 10.1590/1518-8345.1751.2935.

Leavitt, A., Carmeli, Y., Chmelnitsky, I., Goren, M.G., Ofek, I, Navon-Venezia, S. (2010). Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. *Antimicrob. Agents Chemother*. 54 (7): 3002-3006.

Le MINOR. L. Genus III. *Salmonella* Lignières 1900. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg, N.R.; Holt, J.G. (eds.). Williams & Wilkins Co., Baltimore. v.1, p.427-458, 1984.

_____. Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world. [Geneva: WHO, 2003?]. WHO/CDS/ CSR/RMD/2003.6. Disponível em: Acesso em: 12 dez. 2018.

Martínez, J.C., Baquero, F. (2002). Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (4): 647-79.

Martinez, J.L., Fajard, A. L Garmendia , Hernandez A , Linares JF , Martínez-Solano , L., Sánchez M.B . (2009). Uma visão global da resistência aos antibióticos. *FEMS Microbiol. Ver.* Jan; 33 (1): 44-65. doi: 10.1111 / j. 1574-6976.2008.00142.x.

Martínez-Martínez, L.; González-López, J. J... Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 32, p. 4-9, 2014.

Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. (2015) First published: 17 April. Online ISBN: 9781118960608| DOI: 10.1002/9781118960608. Manual de Bergey.

Mayer, L.W. (1988). Use of plasmid profiles in Epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*; 1 (2): 228-243.

Meletis, G. (2016). Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther. Adv. Infect. Dis.* v. 3, n. 1, p. 15–21.

Meletis, G., Oustas E., Bagkeri M. (2014a) Relatórios Carbapenemase dos Balcãs: uma revisão sistemática. *Infez Med* 22 : 85-106.

Meng, J. H., Feng, P., & Doyle, M. P. (2001). Pathogenic *Escherichia coli*. In F. P. Downes & K. Ito (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (4th ed., chap. 35, pp. 331-342). Washington: American Public Health Association.

Moquet, J.S., Crave, A., Viers, J., Seyler, P., Armijos, E., Bourrel, L., (2011). Chemical weathering and atmospheric/soil CO₂ uptake in the Andean and Foreland Amazon basins. *Chemical Geology*, 287: 1-26.

Munoz-Price, L. S.; Poirel, L.; Bonomo, R. A. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet infectious diseases*, v. 13, n. 9, p. 785–96.

Nayzaki, R., Stewart, T., Wang, R.F, Lin, J., Cerniglia, C.E., Kenney, P.B. (2004). Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. *International Journal of Food Microbiology*. v. 91, n.1.

Nicolau,D.P. (2008). .Pharmacokinetic and pharmacodynamics properties of meropenem. *Clin Infect Dis*, v. 47 Suppl 1, p. S32-40.

Nogueira, H.S, Xavier, A. R. E. O., Xavier, M. A. S., Carvalho, A.A. Monção, G.A. Barreto, N.A.P. (2016). Antibacterianos: principais classes, mecanismos de ação e resistência revista Unimontes Científica - Montes Claros, v. 18, n.2.

Nordmann P, Cornaglia G. (2012). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! *Clin. Microbiol. Infect.* May;18(5):411-2. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03795.x.

Nordmann, P.,Dortet,L., Poirel, L. (2012) .Carbapenems resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in molecular medicine*, v. 18, n. 5, p. 263–72, Elsevier Ltd.

Nordmann, P., Naas, T., Poirel, L. (2011). Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*, v. 17, n. 10, p. 1791–8.

Noskin, G. A. (2005). Tigecycline: a new glycylicycline for treatment of serious infections. *Clinical infectious diseases*, v. 41 Suppl 5, p. S303–1.

Okamoto, A.S. (2009). Detecção dos genes *integron*, *inv A* e *spvC* em *Salmonella* Enteritidis proveniente de material avícola e transferência horizontal do gene integron entre Enterobactérias. 69p. Dissertação de Doutorado apresentada ao Departamento de Clínica Veterinária, Universidade Estadual.

Oliveira, S.D., Bessa, M.C., Santos, L.R., Cardoso, M.R.I., Brandelli, A., Canal, C.W. (2011). Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Salmonella* Enteritidis. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.38, n.4, p. 720-728.

OPAS/OMS Brasil –(2017). Dia Mundial da Saúde de 2017.
<https://www.paho.org/bra?id=5391:tema-do-dia-mundial-da-saude-de->

Osano, E., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R. (1994) - Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 38, n. 1, p. 71-8.

Pasteran, F., Mendez, T., Guerriero, L., Rapoport, M., Corso, A. (2009). Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*; v. 47. p.1631-9.

Paterson, D. L., (2003). Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *American Journal of Medicine*, p. 20–28.

Patrick A.D., Grimont & François-Xavier Weill. (2007). Antigenic formulare of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 9th edition - Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

Peloso, P.F.D., Leite, C.C.F., David, R.N.; Filho, H.M.T. (2016). Importância Clínica e Epidemiológica na Detecção Rápida de Bactérias Produtoras de Carbapenemases. *Journal of Infection Control*. V.5, n. 4.

Poirel L, Potron A, Nordmann P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J. Antimicrob. Chemother.* Jul;67(7):1597-606.

Poirel, L., Walsh, T.R., Cuvillier, V., Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infections Disease*, 70, 119-123.

Popoff, M.Y., Le Minor, L. (1997). Taxonomy of the genus *Salmonella*. Changes in serovars nomenclature. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur, Paris, France, p. 5.

Popoff, M. Y.; Minor, L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8th ed. Paris: Pasteur Institute, 2001. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*.

Popoff, M.Y., Bockemühl, J., Gheesling, L.L. (2004) Supplement 2002 (nº 46) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*, v. 155, p. 568-570.

Potron, A., Poirel, L, Rondinaud, E, Nordmann, P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over an 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill*. 2013 Aug 1;18(31). pii: 20549.

Queenam, A.M, Bush, K. (2007). American Society for Microbiology. All Rights Reserved. Carbapenemases: the Versatile – Lactamases *Clinical Microbiology Reviews*, p. 440–458 v. 20, no. 3 -doi:10.1128/CMR.00001-07.

Quintaes, B. Leal, N.C.; Reis, E.M.F.; Fonseca, E.L.; Hofer, E. (2002). Conventional And Molecular Typing Of *Salmonella* typhi Strains From Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v.44, p.315-319.

Regitano, J.B. (2010). Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Comportamento e Impacto Ambiental de Antibióticos usados na Produção Animal Brasileira. *R. Bras. Ci. Solo*, 34:601-616.

_____.Relatório Anual do Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas. (2018) – Fiocruz – IOC- Ministério da Saúde.

Roberts, M.C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*, 245: 195–203.

Rodrigues, D.P., Reis, E.M.F., Araujo, M.S., Marques, G.C.M., Gomes, E.D.T., Santos, A.F. M, Silva, E.O., Silva, G.A., Costa, R.G., Festivo, M.L., Pereira, C.S, Lazaro, N.S., Berto, L.H. (2010). Laboratory based surveillance of *Salmonella* spp. isolated in Brazil from 2000-2009 National Reference Laboratory for Enteric Disease – Oswaldo Cruz Institute-FIOCRUZ. In: International Symposium *Salmonella* And Salmonellosis, Saint Malo, France, Proceedings, p. 377-378.

Rodrigues, D. P.; Lazaro, N. S.; Reis, E. M. F. Manual de procedimentos para diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. 48 p.

Ruppé, É., Woerther, P. L., Barbier, F. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Annals of Intensive Care*, v. 5, n. 1, p. 21,doi: 10.1186/s13613-015-0061-0.

Ryan, M.P., O'dwyer, J., Adley, C.C. (2017). Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant at *Salmonella*. *Hindawi - BioMed Research International*. Volume, Article ID 3782182, 6 pages S1473-3099(15)00424-7.

Scherer, J. S., Calvetti, R.A. (2017). Description of cases of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae subtypes Oxa-48 and NDM public hospital in Porto Alegre. *R Epidemiol Control Infec*, Santa Cruz do Sul, 7(2): 79-84.

Schwarz, S., Charlu-Dancla, E. (1995). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res*, Cambridge, v.32, n.3/4, p.201-226, 2001.

Schwarz, S., and Johnson, A. P. (2016). Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2066–2070. doi: 10.1093/jac/dkw274

Silva, R. M., Silva, R. C., Ribeiro, A. B.(2012). Resíduos de Antibióticos em Leite. *Revista Saúde e Biologia*. v.7, n.1, p. 30-44.

Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American journal of infection control*, v. 34, n. 5 Suppl 1, p. S3–10; discussion S64–73.

Tzoc, E., Arias, M.L., Valiente, C. (2004). Efecto de las aguas residuales hospitalarias sobre los patrones de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Aeromonas* sp. *Rev Biomed*; 15: 165-172.

Tzouvelekis, L. S., Markogiannakis, A., Psychougiou, M., Tassios, P.T., Daikos, G.L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clinical Microbiology Reviews* v. 25 n.4: p. 682 – 707.

Tzouvelekis, L. S. Markogiannakis, A., Piperaki, E., Souli, M., Daikos, G.L (2014). Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect* v. 20, p. 862–72.

Vaidya, V.K. (2011). Horizontal transfer of antimicrobial resistance by extended spectrum lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J. Lab. Physicians*, 3: 37-42.

Varnan, A. H., Evans, M. G. (1996). *Foodborn Pathogens. An Illustrated Text*. London: Marison Publishing. 557p.

Vigilância Sanitária - 2019
[www.rio.rj.gov.br > web > vigilanciasanitaria](http://www.rio.rj.gov.br/web/vigilanciasanitaria)

Villegas, M.V., Lolans, K., Correa, A., Suarez, C.J., Lopez, J.A., Vallejo, M, Quinn, J.P. (2006). First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America Colombian Nosocomial Resistance Study Group *Antimicrob Agents Chemother.* , 50(8):2880-2.

Von Sperling, M. (1996). *Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias* v. 1. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 2nd ed. Belo Horizonte: DESA-UFMG;

Walsh, C. (2003). Where will new antibiotics come from? *Nature reviews. Microbiology*, v. 1, n. 1, p. 65–70.

Walsh, T. R. (2005). The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology and infection*, v. 11 Suppl 6, p. 2–9.

Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., Nordmann, P. (2005). Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clinical microbiology reviews*, v. 18, n. 2, p. 306–25.

Watanabe M., Iyobe, S., Inoue, M., Mitsuhashi, S. (1991). Transferible imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* v. 35, n. 1, p.147–51.

Wellington, E. M. H., Boxall, A.B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M. Johnson-Rollings, A. S. , Jones, D.L. , Lee, N. M. , Otten, W., Thomas, C. M. Williams, A. P. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 13, n. 2, p. 155–165.

Who World Health Organization. (2007). Critically important antibacterial agents for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to nonhuman use. Report of the second WHO Expert Meeting, Copenhagen, 29–31, Geneva.

Who World Health Organization (2015). Report of Salmonella Outbreak Investigations from 2015, <https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks-2015.html>

World Health Organization. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <https://www.who.int › medicines › publications › glob>.
Publication date: 27 February 2017.

Who | World Health Statistics 2018: Monitoring health for the SDGs
<https://www.who.int › gho › publications › 2018>

Woodford, N, Wareham, D, Guerra, B. Teale, C. (2014). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae* from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? *J. Antimicrob Chemother.* Feb; 69(2):287-91. doi: 10.1093/jac/dkt392.

Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A. , Biddle, J. W. Steward, C. D., Alberti, S. , Bush, K. , Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* v. 45, n. 4, p. 1151–61.

Yi-Yun; L., Yang, W., Walsh, Timothy R., Ling-Xian; Y., Rong, Z., James, T., , Yohei; D., Guobao; D. , Baolei; H. Xianhui; Y., Lin-Feng; Gu, Danxia; Hongwei; R. Xiaojie; C., Luchao, L., Dandan, H., Hongwei; Z., Zisen, L. Jian-Hua; L., Jianzhong. S. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in

animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 161–168. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-427

Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C.G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., Walsh, T., R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 53, n. 12, p. 5046-54.

13 – ANEXOS

Artigo Submetido:

- Molecular characterization of *E. coli* carbapenemases isolated from human, animal and, environmental sources

Submetido: Hindawi (Journal of Environmental and Public Health) para ser aceito.

- Carbapenems resistance genes in *Salmonella* spp. isolated from human, animal and, environmental sources.

Em conclusão.