



Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC
Centro de Ciências da Saúde – CCS
Programa de Pós-graduação em Farmácia – PGFAR

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS DE BACILOS GRAM NEGATIVOS RESISTENTES
AOS ANTIMICROBIANOS ENCONTRADOS NO AMBIENTE
HOSPITALAR E NA CRIAÇÃO DE AVES E SUÍNOS NO ESTADO
DE SANTA CATARINA**

Florianópolis, outubro de 2021

Caroline Ribeiro da Cunha

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS DE BACILOS GRAM NEGATIVOS RESISTENTES
AOS ANTIMICROBIANOS ENCONTRADOS NO AMBIENTE
HOSPITALAR E NA CRIAÇÃO DE AVES E SUÍNOS NO ESTADO
DE SANTA CATARINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação
em Farmácia da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial para a obtenção do Grau
de Mestre em Farmácia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Thaís Cristine Marques Sincero
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Jussara Kasuko Palmeiro

Florianópolis, outubro de 2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Cunha, Caroline

Caracterização fenotípica e molecular de isolados de bacilos Gram negativos resistentes aos antimicrobianos encontrados no ambiente hospitalar e na criação de aves e suínos no estado de Santa Catarina / Caroline da Cunha ; orientador, Thaís Cristine Marques Sincero, coorientador, Jussara Kasuko Palmeiro , 2021.

209 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. resistência bacteriana. 3. criação animal . 4. one health. 5. genes de resistência. I. Cristine Marques Sincero, Thaís . II. Kasuko Palmeiro , Jussara . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Caroline Ribeiro da Cunha

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS DE BACILOS GRAM NEGATIVOS RESISTENTES
AOS ANTIMICROBIANOS ENCONTRADOS NO AMBIENTE
HOSPITALAR E NA CRIAÇÃO DE AVES E SUÍNOS NO ESTADO
DE SANTA CATARINA**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Andreza Francisco Martins (UFRGS- Membro Externo)

Dra. Clarissa Feltrin (USP-Suplente)

Prof. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero (UFSC- Orientadora)

Prof. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado do título de mestre em Farmácia.

Florianópolis, 22 de outubro de 2021

“Os sonhos não determinam o lugar que você vai estar, mas produzem a força necessária para o tirar do lugar em que está.”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Somos feitos de marcas e lembranças que são deixadas por aqueles com quem cruzamos durante a vida. Por isso, gostaria de agradecer à todos que estiverem ao meu lado durante essa trajetória.

Agradeço à minha mãe, Solange Terezinha Farias Ribeiro, por ser a minha figura inspiradora de todos os dias. Acredito que um destino é traçado a cada um de nós e, o seu foi de nos mostrar que a força de vontade e dedicação, nos permitem alcançar aquilo que mais desejamos. Obrigada pelo exemplo de amor e carinho deixado. Te amo!

Ao meu pai, Valdemar da Cunha, que soube enfrentar cada dificuldade que a vida lhe deu de forma sensata e sem perder a esperança de tempos melhores. Obrigada pelo exemplo de perseverança e luta. Te amo!

À minha madrastra, Monia Charielli Pontizelli, por todo cuidado e dedicação conosco e com todos ao teu redor. Tenho a tua simplicidade e empatia como um grande exemplo.

Aos meus irmãos, Eduardo Hosang da Cunha e Camila Ribeiro da Cunha, pela cumplicidade e apoio nos momentos em que mais precisei. Sei que nossa amizade é verdadeira pois o tempo não apagou e nem a distância nos separou. Amo vocês!

Ao meu sobrinho, Ítalo da Cunha, que é a alegria da nossa família e que nos supreende todos os dias com a sua inteligência e alegria. Com certeza você tornou nossas vidas mais leve. A tia te ama muito!

À minha avó, Lucia da Cunha, pelo exemplo de mulher batalhadora, pois você me ensinou a não desistir dos meus objetivos e sempre encarar os obstáculos da vida com garra e perseverança. Obrigada!

Ao meu noivo, Vítor Santini Müller, por estar ao meu lado todos os dias. Agradeço todos os dias pelo destino ter colocado você na minha vida. Surpreendo-me com a tua força de encarar as adversidades da vida e assim me mostrando a importância de ser cada dia mais forte. Sou grata por todo o carinho e dedicação por mim, pois é o que preciso para seguir todos os dias motivada a conquistar meus sonhos. Te agradeço pela vida que temos juntos ao lado do nosso pequeno companheiro, Billy. Sei que ainda temos um longo caminho pela

frente, com novos desafios e conquistas. Mas, sei que vamos superar cada desafio e comemorar cada conquista. Te amo!

Aos meus sogros, Rolf e Margarete, pois foram um dos principais apoios para conquistarmos o nosso maior sonho, nossa empresa e casa! Obrigada por cada incentivo e pelo exemplo de família, com certeza são inspiração para o futuro.

Ao meu amigo, Lucas Beltrame, por toda ajuda durante esses anos, pois com a tua alegria e leveza de encarar os desafios, os meus dias e cada experimento realizado se tornaram mais leves e prazerosos. Obrigada!

À minha orientadora, Thaís Cristine Marques Sincero, por ter aceito esse desafio e por todo o conhecimento transmitido.

À minha co-orientadora, Jussara Kasuko Palmeiro, por todo auxílio e orientação durante o período do trabalho.

Aos membros do Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA), em especial à Daniela Cristina Tartari, Caetana Paes Zamparette e Clarissa Feltrin, sem a ajuda de vocês não seria possível a realização deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) pela disponibilidade de materiais e equipamentos para a realização dos meus experimentos e por toda ajuda e companheirismo durante todos esses anos.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela estrutura.

Às fundações *Bill and Melinda Gates* e FAPESC pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma forma me incentivaram a realizar este trabalho.

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe.” Clarice Lispector.

Resumo

Os microrganismos resistentes aos antimicrobianos (MRA) se apresentam de forma progressiva na sociedade, através da transferência de genes de resistência entre distintos microrganismos, destacando-se quando relacionado a diferentes ambientes, principalmente no meio hospitalar e de criação animal. Este trabalho baseou-se na caracterização fenotípica e genotípica de microrganismos resistentes aos antimicrobianos isolados no ambiente hospitalar e de criação de aves e suínos no estado de Santa Catarina. Foi determinado o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados obtidos a partir do Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) e outros testes fenotípicos para a identificação de β -lactamases. Identificou-se a expressão gênica de resistência aos antimicrobianos de todos os isolados e, por fim, determinou-se a concentração inibitória mínima para a Polimixina B de amostras resistentes. Ressalta-se que todos os isolados bacterianos foram identificados pela metodologia MALDI-TOF. Foi obtido um total de 256 isolados bacterianos correspondentes às amostras de granjas, pacientes e transportes. Desses, 173 (68%) isolados eram de Bacilos Gram negativos, os quais foram utilizados no presente trabalho. Observou-se que apenas 6% dos isolados obtidos correspondem às amostras de transportes, 50% para as amostras de granjas e 44% para as amostras de pacientes. O microrganismo predominante nas amostras foi *Escherichia coli*, a qual apresentou resistência de 72% à classe das Penicilinas, 43% às Cefalosporinas, 3% aos Carbapenêmicos, 20% aos Monobactâmicos, 44% às Fluoroquinolonas, 39% aos Aminoglicosídeos, 1% às Tetraciclinas e 48% aos Agentes Diversos (Fosfomicina, Nitrofurantoína e Sulfametoxazol+Trimetropim). Identificou-se que 130 amostras foram positivas para algum dos genes em estudo e, que os genes *bla*_{TEM} (20,7%), *bla*_{TEM}+*bla*_{CTXM} (22,6%), *bla*_{TEM}+*bla*_{KPC} (9,2%), *bla*_{TEM}+ *bla*_{CTXM}+*bla*_{KPC} (12,4%), *bla*_{KPC} (8%) e *bla*_{CTXM} (13,9%) foram os genes mais prevalentes nos isolados obtidos durante o estudo. Considerando os resultados obtidos, foi possível compreender a influência dos diferentes ambientes na disseminação de resistências bacterianas. Diante disso, conclui-se que as maiores taxas de resistência presente nos isolados foram para as classes das Penicilinas (73%) e Cefalosporinas (55%), sendo predominantes em amostras de granjas de suínos orgânicos do período após limpeza, tendo como principal microrganismo identificado *Escherichia coli* (51%), com a prevalência dos genes de resistência *bla*_{TEM} (53%) e *bla*_{CTX-M1} (36%). Finalmente, todas as técnicas utilizadas para a detecção de microrganismos resistentes aos antimicrobianos apresentaram-se eficazes, porém, para as amostras que apresentaram resultados divergentes entre as técnicas fenotípicas, recomenda-se a técnica de sequenciamento para a confirmação dos resultados obtidos.

Palavras-chave: criação animal; resistência bacteriana; ambiente hospitalar; genes de resistência; antimicrobianos; *one health*

ABSTRACT

Title: Phenotypic and molecular characterization of microorganisms resistant to antimicrobials found in the hospital environment and in poultry and swine breeding in the state of Santa Catarina

Antimicrobial resistant microorganisms (ARM) appear progressively in society, through the transfer of resistance genes between different microorganisms, standing out when related to different environments, especially in hospitals and animal husbandry. The work developed is based on phenotypic and genotypically characterizing microorganisms resistant to antimicrobials isolated in hospital and poultry and swine breeding environments in the state of Santa Catarina. The antimicrobial sensitivity profile of the isolates obtained from the Antimicrobial Sensitivity Test (AST) and other phenotypic tests for the identification of β -lactamases was determined. The gene expression of antimicrobial resistance of all isolates was identified and, finally, the minimum inhibitory concentration for Polymyxin B in resistant samples was determined. It is noteworthy that all bacterial isolates were identified by the MALDI-TOF methodology. A total of 256 bacterial isolates corresponding to samples from farms, patients and transports were obtained. Of these, 173 (68%) isolates were from Gram negative Bacilli, which were used in the present work. It was observed that only 6% of the isolates obtained correspond to transport samples, 50% to farm samples and 44% to patient samples. The predominant microorganism in the samples was *Escherichia coli*, which showed resistance of 72% to the class of Penicillins, 43% to Cephalosporins, 3% to Carbapenems, 20% to Monobactams, 44% to Fluoroquinolones, 39% to Aminoglycosides, 1% to Tetracyclins and 48% to Various Agents (Phosphomycin, Nitrofurantoin and Sulfamethoxazole+Trimethoprim). It was identified that 130 samples were positive for some of the genes under study and that the genes bla_{TEM} (20.7%), $bla_{TEM}+bla_{CTXM}$ (22.6%), $bla_{TEM}+bla_{KPC}$ (9.2%), $bla_{TEM}+ bla_{CTXM}+ bla_{KPC}$ (12.4%), bla_{KPC} (8%) and bla_{CTXM} (13.9%) were the most prevalent genes in the isolates obtained during the study. Considering the results obtained, it was possible to understand the influence of different environments on the spread of bacterial resistance. Therefore, it is concluded that the highest rates of resistance present in the isolates were for the classes of Penicillins (73%) and Cephalosporins (55%), being predominant in samples from organic swine farms from the period after cleaning, with the main microorganism identified *Escherichia coli* (51%), with the prevalence of resistance genes bla_{TEM} (53%) and bla_{CTX-M1} (36%). Finally, all the techniques used for the detection of microorganisms resistant to antimicrobials were effective, however, for samples that presented divergent results between the phenotypic techniques, the sequencing technique is recommended to confirm the results obtained.

Keywords: Animal husbandry; Bacterial resistance; Hospital environment

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de resistência bacteriana.....	27
Figura 2. Modelo do conceito de Saúde Única (<i>One Health</i>).....	29
Figura 3. Transmissão de MRA entre humanos e animais.....	32
Figura 4. Principais municípios de origem das aves produzidas em Santa Catarina (2017).....	34
Figura 5. Distribuição da produção de aves destinadas ao abate em 2017.....	35
Figura 6. Principais municípios de origem de suínos produzidos em Santa Catarina (2017).....	36
Figura 7. Distribuição da produção de suínos destinados ao abate em 2017.....	37
Figura 8. Uso dos antimicrobianos em alimentos de origem animal de acordo com os países.....	39
Figura 9. Diagrama representativo das rotas de transmissão da resistência antimicrobiana entre animais, ambiente e humanos.....	42
Figura 10. Nível de exposição do rebanho de aves aos antimicrobianos de 1999 a 2016.....	43
Figura 11. Mecanismo de ação das β -Lactamases.....	52
Figura 12. Fluxograma metodológico para o trabalho realizado.....	60
Figura 13. Localização dos municípios das amostras de transportes do estudo.....	62
Figura 14. Fluxograma metodológico desenvolvido para a coleta dos transportes.....	64
Figura 15. Imagens do procedimento de coleta com <i>swabs</i> dos transportes.....	65
Figura 16. Localização dos pacientes do estudo.....	67
Figura 17. Localização das granjas de aves do estudo.....	69
Figura 18. Localização das granjas de suíno do estudo.....	69
Figura 19. Amostras de granjas de suínos e aves coletadas.....	70
Figura 20. Amostras de granjas de suínos orgânicos.....	71
Figura 21. Metodologia para o isolamento das colônias de interesse clínico nas amostras de transportes e pacientes.....	73
Figura 22. Metodologia para o isolamento das colônias de interesse clínico nas amostras de granjas.....	76
Figura 23. Fluxograma simplificado para identificação de bacilos Gram Negativo.....	79
Figura 24. Fluxograma didático para o teste de triagem com colistina (<i>Colistin-Drop Test</i>).....	85
Figura 25. Halos de inibição formados no teste de triagem com colistina (<i>Colistin-Drop Test</i>).....	86
Figura 26. Placa representativa de microdiluição em caldo para polimixina.....	87
Figura 27. Foto dos produtos amplificadas de cada iniciador.....	95
Figura 28. Fluxogramas resumidos das amostras obtidas.....	97
Figura 29. Isolados de bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose.....	106
Figura 30. Isolados bacterianos obtidos nas amostras de granjas.....	107
Figura 31. Gráfico do número total de isolados bacterianos obtidos para cada paciente.....	109
Figura 32. Isolados bacterianos obtidos no período de internação e alta hospitalar dos pacientes.....	109
Figura 33. Isolados bacterianos obtidos nas amostras de transportes.....	110

Figura 34. Gráfico correspondente ao número total de isolados bacterianos bacilos Gram negativos.....	110
Figura 35. Caracterização das amostras por grupos de famílias.	114
Figura 36. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os isolados de <i>Enterobacterales</i>	119
Figura 37. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os isolados de <i>Enterobacterales</i> em amostras de pacientes.	120
Figura 38. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os isolados de <i>Enterobacterales</i> nas amostras transportes.	122
Figura 39. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os isolados de <i>Enterobacterales</i> nas amostras de granjas de aves.	123
Figura 40. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os isolados de <i>Enterobacterales</i> nas amostras de granjas de suínos.	124
Figura 41. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os isolados de <i>Enterobacterales</i> nas amostras de granjas de suínos orgânicos.....	125
Figura 42. Resistência bacteriana identificada em isolados de <i>Enterobacterales</i> obtidos durante os períodos de coleta das amostras de granjas de suínos orgânicos.	127
Figura 43. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para as amostras de BGN-NF.....	128
Figura 44. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para amostras de BGN-NF em Granjas de aves.	129
Figura 45. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para amostras de BGN-NF em granjas de suínos orgânicos.....	131
Figura 46. Resistência bacteriana identificada em isolados de BGN-NF obtidos durante os períodos de coleta das amostras de granjas de suínos orgânicos.	132
Figura 47. Resistência aos antimicrobianos dos principais microrganismos identificados.....	134
Figura 48. Perfil de resistência para os microrganismos identificados nas amostras de transportes.	136
Figura 49. Perfil de resistência para os microrganismos identificados nas amostras de granjas de suínos.	139
Figura 50. Foto representativa das amostras positivas e negativas obtidas com o Kit Blue-Carba.....	144
Figura 51. Teste positivo para ESBL, através do Teste de Disco aproximação.	149
Figura 52. Fotos representativas das amostras positivas para cada gene de resistência.....	153
Figura 53. Gráfico representativo da amplificação dos genes de resistência por tipo de amostra.	155
Figura 54. Representação total da amplificação dos genes.....	155
Figura 55. Gráfico dos genes de resistência mais prevalentes nos isolados obtidos.	158
Figura 56. Genes encontrados nos microrganismos identificados nas amostras de granjas de suínos.....	164
Figura 57. Genes encontrados nos microrganismos identificados nas amostras de granjas de aves.....	165

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Interpretação da detecção rápida de carbapenemases com o kit Blue-carba.....	83
Quadro 2. Pontos de corte para MIC de Poliximina B, segundo BrCAST.	86
Quadro 3. Sequência de iniciadores utilizados para a identificação dos genes de resistência.....	90
Quadro 4. Condições para as reações de PCR.....	93
Quadro 5. Farmacoterapia vigente durante o período de internação para cada paciente.	99
Quadro 6. Descrição das amostras coletas de granjas de suínos e aves.	101
Quadro 7. Descrição das amostras coletas de granjas de suínos orgânicos.	103
Quadro 8. Quantificação total de isolados bacterianos conforme antimicrobiano utilizado na seleção.....	105
Quadro 9. Resistência aos antimicrobianos nos microrganismos identificados nas amostras não fermentadoras da glicose.	141
Quadro 10. Resultados obtidos para as amostras com resistência aos carbapenêmicos.....	145
Quadro 11. Caracterização das amostras positivas para ESBL.	151
Quadro 12. Quadro do número de isolados positivos para determinados genes de resistência para amostras de pacientes.	159
Quadro 13. Genes positivos nos microrganismos identificados nas amostras de pacientes.	161
Quadro 14. Genes positivos nos microrganismos identificados nas amostras de transportes.....	162

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição do isolados bacterianos obtidos nas amostras de granjas.	107
Tabela 2. Descrição dos isolados bacterianos obtidos nas amostras de pacientes.	108
Tabela 3. Identificação dos isolados obtidos de cada tipo de amostra.	116
Tabela 4. Perfil de resistência para os microrganismos identificados nas amostras de granjas de suínos orgânicos.	137
Tabela 5. Perfil de resistência para os microrganismos identificados nas amostras de pacientes.	137
Tabela 6. Isolados positivos para ESBL.....	149
Tabela 7. Distribuição de genes amplificados por isolado.....	154
Tabela 8. Prevalência dos genes de resistência encontrados em cada tipo de amostra.....	157
Tabela 11. Genes encontrados nos microrganismos identificados nas amostras de granjas de suínos orgânicos.	167
Tabela 12. Concentração inibitória Mínima para Polimixina B.	169

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA**- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AGP**- *Antimicrobial growth promoters*
- BrCAST**- *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- BHI**- *Brain heart infusion*
- CLSI**- *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- EMBRAPA**- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EUA**- Estados Unidos da América
- ESBL** – B Lactamase de Espectro Estendido
- HU** - Hospital Professor Polydoro Ernani de São Thiago
- IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- Kb**- Kilobases
- MALDI-TOLF** - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, Time of flight*
- MIC** - Concentração Inibitória Mínima
- MIMA** - Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada
- MRA**- Microrganismo Resistente aos Antimicrobianos
- MRSA** - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*
- OMS** - Organização Mundial da Saúde
- pb**- Pares de bases
- PBPs**- *Penicillin-binding proteins*
- PCR** - Reação em Cadeia de Polimerase
- PIB** - Produto Interno Bruto
- Sisgen** - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
- TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- TSA** - Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
- UFSC** - Universidade Federal de Santa Catarina
- VBP**- Valor Bruto da Produção Agropecuária
- VP** - Valor Presente
- VRE** - *Enterococcus* resistentes à vancomicina

LISTA DE SÍMBOLOS

Grandeza	Unidade	Símbolo
Volume	Microlitros	μl
Tempo	Min	Min
Temperatura	Graus celsius	$^{\circ}\text{C}$
Massa	NanoGramas	ng
Massa	Gramas	g
Acidez/basicidade	Potencial Hidrogênico	pH
Aceleração da gravidade	ms^2	G
Aceleração	Rotação por min	rpm
Distância	Nanômetro	nm

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	21
2.	OBJETIVO GERAL	25
2.1	Objetivos específicos	25
3.	REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1	Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos	26
3.1.1	Alteração da permeabilidade	26
3.1.2	Modificação do alvo	26
3.1.3	Bombas de efluxo	27
3.1.4	Inativação enzimática	27
3.2	Resistência bacteriana no contexto de saúde única	28
3.3	Transmissão de genes de resistência na comunidade	30
3.4	Importância econômica da criação animal no estado de Santa Catarina.....	32
3.4.1	Cenário atual	32
3.4.2	Criação de aves em Santa Catarina	33
3.4.3	Criação de suínos em Santa Catarina	35
3.5	Utilização de antimicrobianos na criação animal	37
3.6	Resistência aos antimicrobianos na criação animal	41
3.6.1	Cenário atual	41
3.6.2	Estudos realizados	42
3.6.2.1	Estudos sobre o uso de antimicrobianos na criação de aves	42
3.6.2.2	Estudos o uso de antimicrobianos na criação de suínos	44
3.7	Efeitos dos Resíduos de Antimicrobianos em Alimentos	47
3.8	Microrganismos resistentes aos antimicrobianos (MRA)	48
3.9	Principais genes de resistência	49
3.9.1	β -lactamases	49
3.9.1.1	β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs).....	51
3.9.1.2	β -Lactamases de Classe A (Serino-carbapenemases).....	52
3.9.1.3	β -Lactamase de Classe B (Metallo- β -lactamase).....	55
3.9.2	Carbapenemases	56
3.9.2.1	Gene <i>blaOXA-48</i>	56
3.9.2.2	Gene <i>blaKPC</i>	56
3.9.3	Fosfoetanolamina transferase	57
3.9.3.1	Gene <i>mcr</i>	57
4.	METODOLOGIA	59
4.1	Estratégia.....	59

4.2	Obtenção das amostras	61
4.2.1	Amostras de transportes.....	62
4.2.2	Amostras de pacientes	65
4.2.3	Amostras de granjas de suínos e aves	68
4.2.4	Amostras de suínos de agricultura familiar	70
4.3	Técnicas microbiológicas	71
4.3.1	Isolamento de colônias de interesse clínico - Amostras pacientes e transportes.....	71
4.3.2	Isolamento de colônias de interesse clínico – Amostras de granjas.....	74
4.3.3	Triagem dos isolados através de testes bioquímicos	77
4.3.4	Identificação por MALDI-ToF	79
4.3.5	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA)	80
4.3.6	Teste Blue-Carba	82
4.3.7	Teste de triagem – “ <i>Colistin Drop Test</i> ”	83
4.3.8	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para Polimixina B	86
4.4	Técnicas não dependentes de cultura celular	89
4.4.1	Extração de DNA.....	89
4.4.2	Iniciadores	89
4.4.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	92
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
5.1	Descrição das amostras coletadas.....	96
5.1.1	Amostras de Pacientes	98
5.1.2	Amostras de Granjas de Aves e Suínos	100
5.1.3	Amostras de Granjas de Suínos orgânicos.....	102
5.2	Isolados obtidos	104
5.3	Identificação por MALDI-TOF.....	112
5.4	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.....	118
5.4.1	Perfil de Sensibilidade aos antimicrobianos para as amostras de <i>Enterobacterales</i>	118
5.4.2	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos para as amostras de Bacilos Gram negativo não fermentadores de glicose (BGN-NF).....	128
5.4.3	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos identificados.....	133
5.4.3.1	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos da ordem <i>Enterobacterales</i>	133
5.4.3.2	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos não fermentadores da glicose	140

5.5	Identificação de resistência aos carbapenêmicos	142
5.5.1	Teste Blue-Carba	142
5.5.2	Identificação fenotípica para ESBL	148
5.6	Amplificação dos genes de resistência.....	152
5.7	Amplificação dos genes de resistência nos microrganismos identificados.. ..	160
5.8	Determinação da Concentração Inibitória Mínima para Polimixina B	168
6.	SUMÁRIO DE RESULTADOS	172
7.	CONCLUSÃO	176
8.	SUGESTÕES	177
9.	REFERÊNCIAS	178
10.	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) ...	193
11.	APÊNDICE B - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.	197
12.	APÊNDICE C - Scores obtidos para cada isolado na identificação MALDI-ToF.....	201
13.	APÊNDICE D - Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos de bacilos Gram-negativos fermentadores da glicose.....	205
14.	APÊNDICE E - Perfil de Sensibilidade encontrado para as amostras de bacilos Gram negativos não fermentadoras de glicose, conforme tabelas de ponto de corte do BrCAST.	209

1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é considerada um dos problemas de saúde pública mais relevantes mundialmente, já que muitas bactérias deixaram de responder aos efeitos desses fármacos (WHO, 2005). O desenvolvimento da MRA (Microrganismos Resistentes aos Antimicrobianos) é um fenômeno natural, entretanto, o maior consumo de antimicrobianos tem sido apontado como o responsável principal pelos altos níveis de resistência atuais (WHO, 2015).

Os MRA se apresentam de forma progressiva na sociedade, através da transferência de genes de resistência entre distintos microrganismos, patogênicos e não patogênicos, destacando-se quando relacionado a diferentes ambientes, principalmente no meio hospitalar e em seus usuários, onde apresenta uma situação de ameaça ao conjunto terapêutico para o tratamento de diversas infecções (ZINSSTAG *et al.*, 2011).

Atualmente, o grande desafio terapêutico encontrado é realizar a prescrição do antimicrobiano adequado em um curto período de tempo. Geralmente, leva-se dias para determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, portanto, são usados protocolos que recomendam tratamentos empíricos, utilizando antimicrobianos de amplo espectro. Essa abordagem pode salvar vidas, mas traz consequências. A Organização Mundial da Saúde (OMS), prevê que sem uma ação urgente, a disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos levará ao ressurgimento de mortes por ferimentos leves e infecções não complicadas até então consideradas benignas (NATURE, 2018).

As consequências clínicas e econômicas dos MRA são graves e se relacionam com o aumento da morbidade e mortalidade das doenças infecciosas. Por sua vez, a hospitalização prolongada e o uso de diferentes antimicrobianos aumenta os custos dos cuidados de saúde, o que constitui um problema relevante, devido aos recursos destinados aos sistemas de saúde e a conjuntura econômica e financeira do país (LOUREIRO *et al.*, 2016).

Estima-se que cerca de 700 mil pessoas morrem por ano devido às infecções causadas por MRA, o que causa um custo econômico considerável, além do custo humano imensurável. É estimado um aumento contínuo da

resistência bacteriana até 2050, que poderá levar 10 milhões de pessoas a morte, ou seja, uma morte a cada três segundos e uma redução de 2 a 3,5% no Produto Interno Bruto (PIB). O custo mundial estimado é de até 100 trilhões de dólares (O'NEILL, 2014).

Como resultado da interação de muitos microrganismos com o meio ambiente, é esperado o surgimento de MRA. A maioria dos compostos antimicrobianos são moléculas produzidas naturalmente e, bactérias co-residentes desenvolveram mecanismos para superar sua ação, a fim de sobreviver utilizando mecanismos intrínsecos de resistência aos antimicrobianos. Ao discutir o enigma da resistência antimicrobiana, bactérias intrinsecamente resistentes aos antimicrobianos não são o foco principal do problema. Em contextos clínicos, a importância é normalmente atribuída à “resistência adquirida” em uma população bacteriana originalmente suscetível ao composto antimicrobiano (MUNITA; ARIAS, 2016).

O desenvolvimento da resistência adquirida pode resultar de mutações em genes ou devido à aquisição de determinantes genéticos externos de resistência, provavelmente obtidos de organismos intrinsecamente resistentes presentes no ambiente. Portanto, o ambiente está diretamente relacionado com a presença de novos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, principalmente quando há uma correlação entre diversos meios, sobretudo o ambiente humano e o ambiente agrícola/animal (MUNITA; ARIAS, 2016).

Hoje, observa-se ainda um cenário de utilização pouco criteriosa e/ou em larga escala dos antimicrobianos, especialmente como promotores de crescimento na criação de animais e na medicina veterinária. O uso de antimicrobianos na medicina veterinária, bem como a necessidade de controle de seu uso, torna-se um problema ainda maior quando usado em animais de produção de alimentos, assim, o uso de antimicrobianos em animais pode ter efeitos diretos e indiretos na saúde humana (NGANGOM *et al.*, 2019).

Os efeitos diretos são aqueles que podem estar relacionados ao contato com bactérias resistentes aos antimicrobianos presentes em animais destinados à alimentação, e os efeitos indiretos são aqueles que resultam do contato com organismos resistentes que foram transmitidos para vários componentes do

ecossistema (por exemplo, água e solo) como resultado do uso de antimicrobianos em animais para alimentação (NGANGOM *et al.*, 2019).

Diante disso, há a preocupação com os resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem animal em duas situações; com potencial ameaça para toxicidade direta em humanos e como, modificadores da microflora e reforçadores do surgimento de resistência bacteriana, através do aumento das taxas de mutações, as quais estimulam a troca de elementos genéticos móveis e recombinações (ANDERSSON; HUGHES, 2014). Assim, tais situações favorecem o surgimento de infecções e resultam na ineficácia da terapia antimicrobiana adotada (NGANGOM *et al.*, 2019).

Para evitar esses riscos, é necessário usar medicamentos racionalmente, ou seja, usá-los apenas quando eles são realmente indicados e de maneira adequada. Estudos apontam que protocolos elaborados com base na microbiologia local, tem um impacto direto na redução de infecções em pacientes internados. Enfatiza-se que os protocolos apresentam um foco na educação continuada, fornecendo informações e considerando resultados por meio de indicadores de adesão às boas práticas de biossegurança e análise das prescrições de antimicrobianos (DE MELLO; OLIVEIRA, 2021).

A luta contra o desenvolvimento de MRA levou, principalmente a clínica comunitária e, recentemente o ambiente agrícola a controlar os tratamentos à base de antimicrobianos, tendo como objetivo reduzir a transmissão e impedir a seleção de bactérias resistentes durante o tratamento. Nos últimos anos, o papel do meio ambiente como fonte importante e via de disseminação da resistência tem sido cada vez mais reconhecido (BENGTSSON-PALME; KRISTIANSOON; LARSSON, 2018).

Segundo, a OMS (2015) diferentes setores, incluindo medicina humana e veterinária, agricultura, finanças, meio ambiente e consumidores devem estabelecer ações para combater a resistência antimicrobiana. Nesse sentido foi estabelecido o conceito “*One Health*” – Saúde Única, o qual se baseia na implementação do pensamento contemporâneo sobre saúde e ecossistemas e sua relevância para o desenvolvimento global da saúde pública, animal e do meio ambiente, o qual reduzirá os riscos de doenças infecciosas entre animais e ecossistemas humanos (ZINSSTAG *et al.*, 2011).

Diante disso, *Sheahan* e colaboradores (2019) destacaram que pouco se sabe sobre a importância epidemiológica dos patógenos transmitidos entre a comunidade e hospitais, bem como os tipos de patógenos contidos nas ambulâncias, já que as mesmas frequentemente transportam pacientes, muitas vezes imunocomprometidos, entre vários ambientes públicos e hospitalares, portanto são veículos potenciais de transmissão de diversos microrganismos (SHEAHAN *et al.*, 2019).

Nesse contexto, percebe-se que MRA e a transferência de genes de resistência entre distintos microrganismos, patogênicos e não patogênicos, bem como entre diferentes ambientes, comunitários, hospitalares e de criação animal, é um fenômeno altamente dinâmico, crescente e que tem ameaçado a efetividade do tratamento de infecções microbiana diante do restrito arsenal terapêutico disponível (SHEAHAN *et al.*, 2019).

Considerando o exposto, o presente trabalho, vinculado ao projeto “Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambiente hospitalar e de criação animal”, o qual teve como objetivo caracterizar fenotípicamente e molecularmente os microrganismos resistentes aos antimicrobianos encontrados em amostras de ambientes, hospitalar e animais.

2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar fenotípica e genotipicamente microrganismos resistentes aos antimicrobianos isolados no ambiente hospitalar e de criação de aves e suínos no estado de Santa Catarina.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de Bacilos Gram Negativos;
- 2) Determinar fenotipicamente a presença de ESBL;
- 3) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a Poliximina B das amostras resistentes;
- 4) Identificar genes de resistência aos antimicrobianos dos isolados de Bacilos Gram negativos;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos

3.1.1 Alteração da permeabilidade

A resistência aos antimicrobianos está associada à diminuição da permeabilidade da membrana externa das bactérias Gram-negativas. O fluxo de moléculas para dentro da célula acontece por características intrínsecas como carga, dimensão, estrutura e, principalmente, através de proteínas de membrana, as quais são responsáveis por formarem canais de entrada e saída de substâncias. Os antimicrobianos utilizam desse percurso para atingir o espaço periplasmático, como é o caso dos antimicrobianos β -lactâmicos. Desta forma, qualquer dano ou perda de função destas proteínas, pode levar à diminuição da sensibilidade a vários antimicrobianos (DE OLIVEIRA CUNHA, 2014).

3.1.2 Modificação do alvo

A resistência ocorre devido a substituições de aminoácidos nas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), fazendo com que a ligação com o agente antimicrobiano torne-se menos susceptível. A modificação desses aminoácidos pode acontecer devido à presença de proteínas provenientes da recombinação entre genes codificadores de PBPs associadas à expressão de susceptibilidade, a hiperprodução da proteína, ou a aquisição de novas PBPs que levam a um aumento do nível de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos. Há outros tipos de alteração do alvo, como mutação da DNA girase, responsável por expressar resistência às fluoroquinolonas, e também mutação dos ribossomos constituintes da parede celular (DE OLIVEIRA CUNHA, 2014).

3.1.3 Bombas de efluxo

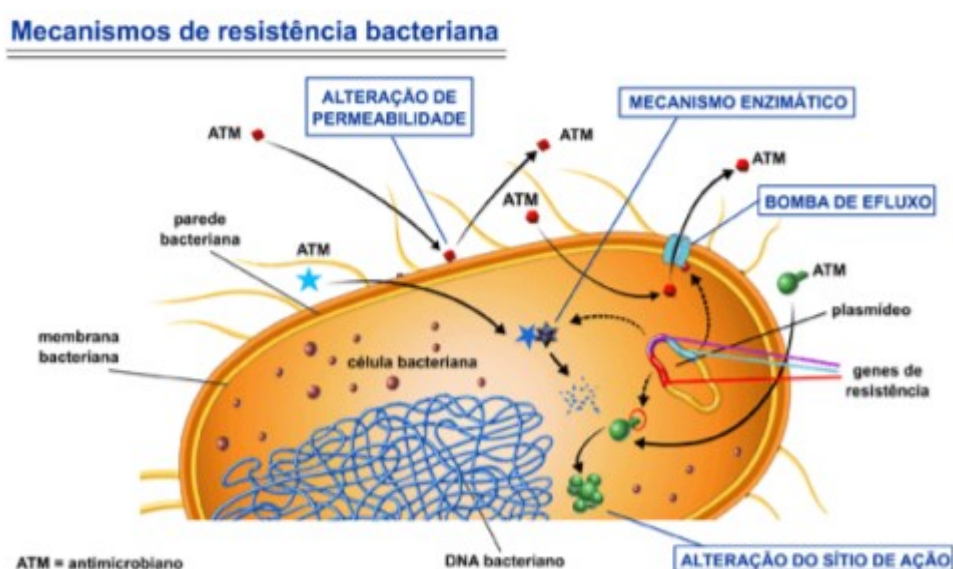
Caracterizado pelo bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular, este mecanismo gera uma resistência bacteriana a determinados antimicrobianos, como é o caso da resistência às tetraciclinas codificada por plasmídeos em *Escherichia coli*, devido à presença de proteínas integrantes da membrana plasmática bacteriana (DE OLIVEIRA CUNHA, 2014).

3.1.4 Inativação enzimática

Algumas bactérias apresentam genes codificadores de enzimas que causam a destruição do antimicrobiano através do processo de hidrólise, assim, causando a inativação de uma variedade de antimicrobianos.

Portanto, quando a bactéria utiliza de um destes mecanismos, ou uma combinação deles, na maioria das vezes causa sérios problemas na escolha da antibioticoterapia ideal, pois tem se tornado resistente até aos antimicrobianos mais promissores, conforme é ilustrado na **Figura 1** (DE OLIVEIRA CUNHA, 2014).

Figura 1. Mecanismos de resistência bacteriana.



Fonte: (DE OLIVEIRA CUNHA, 2014)

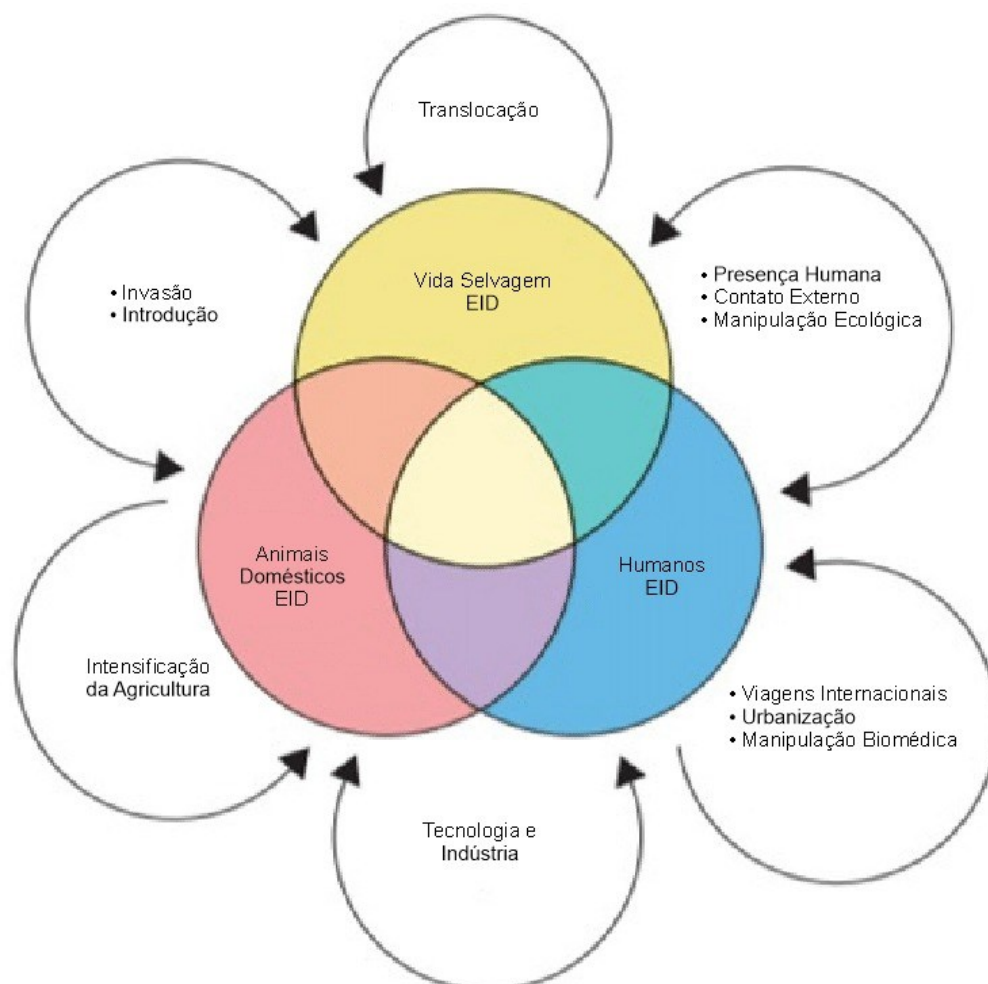
3.2 Resistência bacteriana no contexto de saúde única

As doenças infecciosas presentes em animais e que podem ser transmitidas aos humanos (zoonoses) tem seu crescimento relacionado a diversos fatores. Estima-se que cerca de 60% das recentes doenças humanas sejam originárias de animais (MWANGI; DE FIGUEIREDO; CRISCITIELLO, 2016).

Sendo assim, existe o interesse de integrar diferentes campos profissionais, os quais incorporam as ciências ambientais, a partir do conceito de “*One Health*”- Saúde Única, termo usado para as análises de zoonoses, particularmente, onde considera-se todos os componentes que podem potencializar o aumento ou surgimento de uma doença. Esses componentes incluem, os ambientais, ecológicos, animais selvagens, domésticos e fatores humanos. O último abrange questões comportamentais e médicas, incluindo questões culturais, fatores políticos e outras características socioeconômicas que podem resultar na ocorrência ou disseminação da doença (CUNNINGHAM; DASZAK; WOOD, 2017).

A primeira revisão de doenças emergentes utilizando o conceito “*One Health*” foi realizada por Daszak e colaboradores (2000), a qual reuniu informações veterinárias, ecológicas, conservação e perspectivas médicas humanas sobre essas doenças (CUNNINGHAM; DASZAK; WOOD, 2017), esse conceito é ilustrado na Figura 2.

Figura 2. Modelo do conceito de Saúde Única (*One Health*).



Legenda: EID- Doenças Infecciosas Emergentes. Fonte: Adaptado de (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000)

O crescimento da economia global permitiu a rápida disseminação de doenças zoonóticas e infecções em populações carentes (SMITH *et al.*, 2014). Logo, se vê necessário o pensamento sobre a saúde a partir de uma perspectiva integrada, ou seja, que envolva o conhecimento de fatores humanos, animais e ambientais (MWANGI; DE FIGUEIREDO; CRISCITIELLO, 2016).

Dados de censos oficiais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2010) apontam que em 1950 a população brasileira era 36,16% caracterizada como urbana e, em 2010 esse valor aumentou para 84,36%.

Grande parte da população vive em centros urbanos, o que possibilita a transmissão de doenças em áreas peri-urbanas ou urbanas, devido à emergência ou re-emergência de seus vetores nessas áreas (TAUIL, 2006).

A rápida urbanização acarreta a redução da qualidade sanitária das cidades, com conseqüente aumento de transmissão de várias doenças infecciosas e precarização do atendimento hospitalar (TAUIL, 2006).

No ambiente hospitalar é essencial apresentar abordagens inovadoras pela equipe de saúde, que permitam melhorar a assistência ao paciente e promover ambientes saudáveis para todos (RABINOWITZ *et al.*, 2017).

Pacientes hospitalizados são mais propensos a adquirirem possíveis infecções, pois apresentam geralmente algum grau de imunocomprometimento e estão sujeitos a diversas terapias medicamentosas e/ou procedimentos invasivos (DE QUEIROZ, 2004). Logo, é essencial que no ambiente hospitalar haja maior controle e prevenção da disseminação de bactérias multirresistentes, as quais podem dificultar ainda mais o tratamento das infecções.

3.3 Transmissão de genes de resistência na comunidade

Na criação animal, os antimicrobianos são usados no tratamento de infecções bacterianas específicas, como profilaxia e favorecendo o crescimento desses animais. Alguns países proibiram o uso de promotores de crescimento antimicrobianos, permitindo apenas em um intervalo restrito e outros apresentam controle limitado ou nenhum controle sobre o uso desses medicamentos (MARON; SMITH; NACHMAN, 2013). Muitos dos antimicrobianos utilizados para profilaxia e fins terapêuticos em animais, pertencem às mesmas classes usadas na medicina humana. Como resultado disso, MRA presentes em isolados de animais tornam-se um problema de saúde pública, pois essas bactérias podem ser facilmente transferidas do animal para o humano via contato direto ou via cadeia alimentar (DEWAAL, 2012).

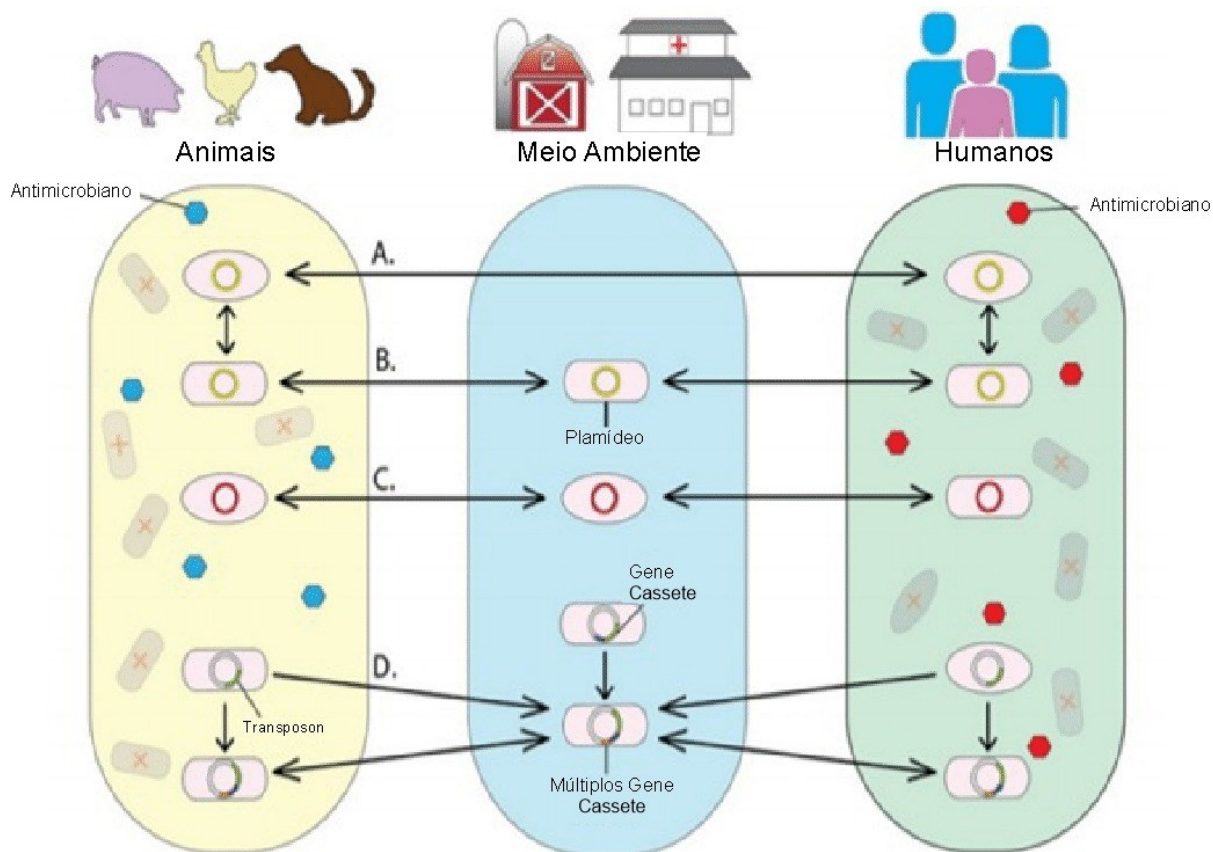
A Figura 3 mostra as diferentes rotas de transmissão de MRA entre humanos e animais. A principal rota de transmissão de MRA entre humanos e animais ocorre por contato direto ou através da cadeia alimentar. Bactérias zoonóticas resistentes aos antimicrobianos, como *E.coli* produtora de shiga-toxina (STEC), *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. transferem seus genes para os diferentes hospedeiros e causando infecções (DEWAAL, 2012). Além disso, *E.coli* comensal não patogênica que são resistentes aos antimicrobianos

podem transferir e dispersar genes de resistência para patógenos humanos por transferência horizontal de genes. A genética móvel através de elementos como plasmídeos, transposons e integrons que carregam esses genes de resistência, podem se mover de humanos para animais e vice-versa, através do ambiente (MARON; SMITH; NACHMAN, 2013).

O movimento de alimento e produtos animais através do mundo estende ainda mais a propagação de MRA, portanto, tornando-se uma problema não apenas para um único país, mas uma preocupação mundial (AARESTRUP, 2005). Além, das rotas internacionais de pessoas e produtos alimentícios, as aves migratórias também são consideradas responsáveis pela transmissão de MRA entre os continentes (COLE *et al.*, 2005). Outra possível rota de transmissão é o movimento de MRA de humanos para animais. Há casos relatados em que humanos que trabalham com animais podem transferir MRA para animais, particularmente animais selvagens, mas também para animais de estimação e animais produtores de alimentos. Isso foi demonstrado em um estudo onde o isolamento de bactérias multirresistentes foi considerado maior em animais de estimação seguido por animais de fazenda e menor em animais selvagens (JOBINS; ALEXANDER, 2015) (SKURNIK *et al.*, 2006).

Na produção animal, os MRA podem ser amplificados devido à pressão de seleção antimicrobiana dos antimicrobianos. Uma vez amplificado, essas bactérias podem representar um risco potencial à saúde pública para humanos. Além de animais de alimentação, o uso de antimicrobianos em animais domésticos também tem contribuído para a movimentação de MRA para os humanos (VENTER *et al.*, 2017).

Figura 3. Transmissão de MRA entre humanos e animais.



(A) Transmissão direta de bactérias resistentes aos antimicrobianos entre humanos e animais. (B) Transmissão de genes determinantes resistentes codificados em cromossomos ou plasmídeos. (C) Elementos genéticos móveis (plasmídeos) que transportam e disseminam genes de resistência. (D) Transmissão de resistência via transposons, integrons montados em cassetes de genes e regiões multirresistentes carregando matriz de cassetes de genes resultando em múltiplos MRA em bactérias dentro do mesmo hospedeiro ou entre animais e humanos. Fonte: Adaptado de (VENTER *et al.*, 2017)

3.4 Importância econômica da criação animal no estado de Santa Catarina

3.4.1 Cenário atual

O estado de Santa Catarina é considerado um grande produtor de alimentos e, em 2019 ampliou seu faturamento no setor agropecuário. O Valor Bruto da Produção Agropecuária (VBP) chegou a R\$ 33,6 bilhões, um aumento de 8,8% em relação ao ano anterior. A alta foi estimulada, principalmente pelo desempenho da produção pecuária. Esses dados fazem parte da Síntese Anual

da Agricultura e dos Indicadores de Desempenho da Agricultura e do Agronegócio de Santa Catarina (EPAGRI, 2020).

Segundo o secretário adjunto da Agricultura, da Pesca e Desenvolvimento Rural, Ricardo Miotto:

Com pouco mais de 1% do território brasileiro, Santa Catarina é referência em várias atividades agropecuárias, desde a produção de proteína animal, cultivo de ostras e mexilhões e também a produção vegetal e florestal. Nós tivemos crescimentos importantes em diversos setores, principalmente na produção de carnes, devido às exportações de carne suína e de aves.

Destaca-se a suinocultura na agropecuária catarinense em 2019, a qual superou o valor da produção de frangos pela primeira vez em 20 anos. A produção de suínos se tornou responsável por 19,2% do VBP catarinense, alcançando um valor de R\$ 6,47 bilhões. As receitas geradas pela cadeia produtiva, na fase de criação dos animais, foram 35% maiores do que em 2018 (EPAGRI, 2020).

Portanto, a produção animal respondeu por 60% do VP (Valor Presente) da agropecuária de Santa Catarina. Em 2019, o faturamento do setor foi de R\$ 20,14 bilhões, com alta de 14,9% em relação ao ano anterior e, o VP da avicultura, que até 2018 ocupava o primeiro lugar no ranking de faturamento, fechou em R\$ 6,41 bilhões em 2019. Seguido pela produção de leite, presente em 80% dos municípios de Santa Catarina, com um VP de R\$3,72 bilhões e um crescimento de 7,7% em comparação com 2018 (EPAGRI, 2020).

3.4.2 Criação de aves em Santa Catarina

A Pesquisa Trimestral do Abate de Animais, do IBGE, demonstra que em 2017 foram abatidos 859,61 milhões de frangos em Santa Catarina, queda de 1,27% em relação ao ano anterior (EPAGRI, 2017).

Segundo a Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (Cidasc), órgão responsável pela sanidade animal e vegetal, em 2017 foram produzidas e destinadas ao abate um total de 883,08 milhões de frangos no Estado. Esse número inclui tanto as aves cuja finalidade principal é o abate (frangos de corte), quanto aquelas com outras finalidades, mas que, em algum momento, são destinadas ao abate. São contabilizados somente os animais

abatidos em estabelecimentos inspecionados, seja em Santa Catarina ou em outras unidades da federação (EPAGRI, 2017).

Das 883,08 milhões de aves produzidas em 2017, 97,77% foram abatidas em Santa Catarina. O restante foi abatido no Paraná (1,58%), Rio Grande do Sul (0,32%), São Paulo (0,30%), Minas Gerais (0,02%) e Paraíba (0,0004%) (EPAGRI, 2017).

A mesorregião Oeste Catarinense foi responsável por 79,43% da produção catarinense de frangos em 2017, enquanto no ano anterior eram 78%. Portanto, os 10 municípios que mais produziram frangos em 2017 localizam-se na mesorregião Oeste e concentram 22,06% do total de aves abatidas nesse ano, conforme é ilustrado na Figura 4 (EPAGRI, 2017).

Figura 4. Principais municípios de origem das aves produzidas em Santa Catarina (2017).

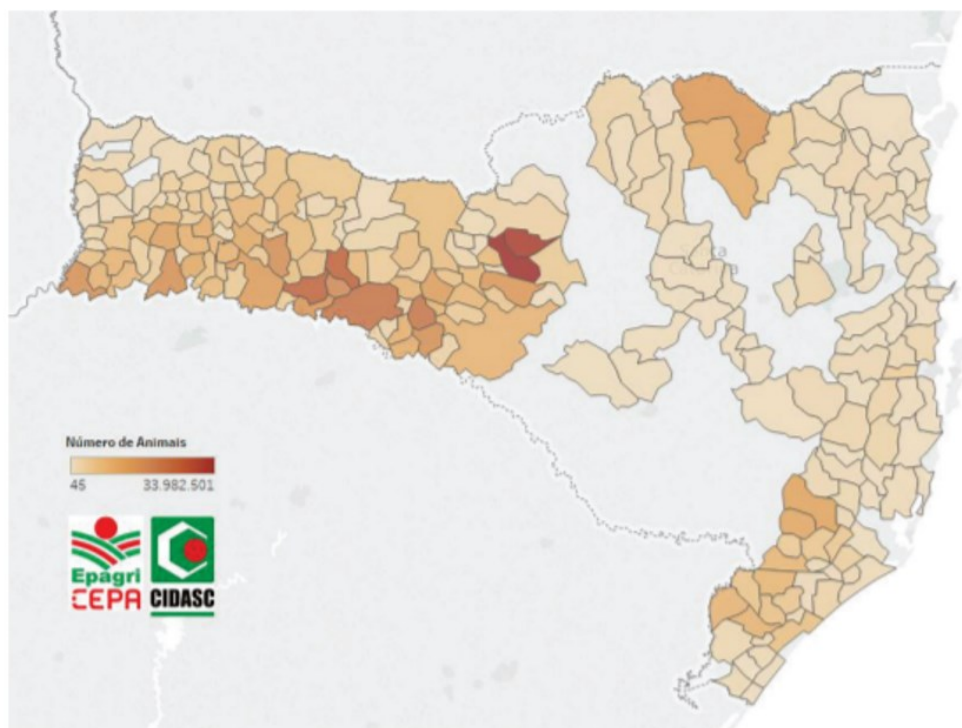
Município		Nº aves (milhões) ⁽¹⁾	%
1º	Videira	33,98	3,85
2º	Rio das Antas	31,55	3,57
3º	Ipumirim	24,92	2,82
4º	Seara	24,88	2,82
5º	Concórdia	21,81	2,47
6º	Ouro	21,14	2,39
7º	Arabutã	17,29	1,96
8º	Xaxim	16,22	1,84
9º	Capinzal	16,01	1,81
10º	Palmitos	15,86	1,80
Demais municípios		659,41	74,67
Total		883,08	100,00

⁽¹⁾ Os dados incluem as aves abatidas em Santa Catarina (97,77%) e em outras UFs (2,23%), bem como as diversas categorias de galinhas destinadas ao abate.

Fonte: (EPAGRI, 2017)

O mapa da Figura 5, apresenta a distribuição da produção de frangos destinados ao abate no ano de 2017, de acordo com o município de origem. São contabilizadas todas as categorias destinadas ao abate, abatidas em Santa Catarina ou outra unidade da federação.

Figura 5. Distribuição da produção de aves destinadas ao abate em 2017.



Fonte: Elaborado por Epagri/Cepa, a partir de dados da Cidasc.

Legenda: Quanto mais escuro, maior o número de animais produzidos.

Fonte: (EPAGRI, 2017)

3.4.3 Criação de suínos em Santa Catarina

Segundo dados da Pesquisa Trimestral do Abate de Animais, em 2017 foram abatidos em Santa Catarina 11,50 milhões de suínos, 7,20% mais que em 2016. O crescimento no número de abates se manteve em 2018, embora em ritmo menor que no ano anterior (EPAGRI, 2017).

Pelo quarto ano consecutivo a produção de carne suína de Santa Catarina registrou aumento, ultrapassando, pela primeira vez, a marca de 1 milhão de toneladas. De acordo com o IBGE, em 2017 a produção catarinense foi de 1,03 milhão de toneladas de carcaça, 5,94% acima do registrado no ano anterior. Vale ressaltar que a produção brasileira cresceu apenas 3,06% no mesmo período, fazendo com que o estado ampliasse sua participação no total nacional (EPAGRI, 2017).

Embora esteja presente em 18 das 20 microrregiões de Santa Catarina, a suinocultura concentra-se no oeste do estado. A mesorregião do Oeste

Catarinense (Concórdia, Joaçaba, Chapecó, São Miguel do Oeste e Xanxerê) foi responsável por 78,88% dos animais produzidos em 2017 (EPAGRI, 2017).

Dos 10 municípios com maior produção em 2017, 8 são da mesorregião do Oeste Catarinense (Concórdia, Videira, Seara, Xavantina, São Carlos, Palmitos Irani e Lindóia do Sul), um é do Sul Catarinense (Braço do Norte) e um da mesorregião Serrana (Campos Novos), conforme é ilustrado na Figura 6 (EPAGRI, 2017).

Figura 6. Principais municípios de origem de suínos produzidos em Santa Catarina (2017).

Município		Nº de cabeças (mil) ⁽¹⁾	%
1º	Concórdia	737,47	5,81
2º	Videira	436,40	3,44
3º	Seara	388,12	3,06
4º	Braço do Norte	309,85	2,44
5º	Campos Novos	261,50	2,06
6º	Xavantina	256,91	2,03
7º	São Carlos	250,56	1,98
8º	Palmitos	250,14	1,97
9º	Irani	248,71	1,96
10º	Lindóia do Sul	241,74	1,91
Demais municípios		9.301,92	73,34
Total		12.683,31	100

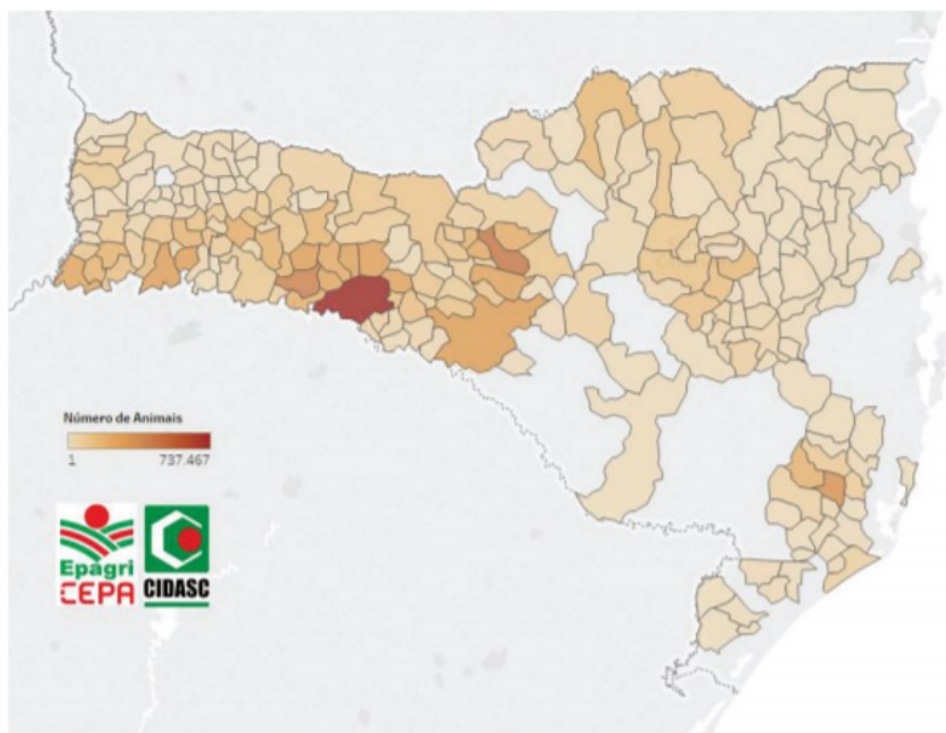
⁽¹⁾ Inclui os suínos criados e abatidos em Santa Catarina (87,72%) e aqueles criados no estado e abatidos em outras UFs (12,28%).

Fonte: Cidasc.

Fonte: (EPAGRI, 2017)

O mapa da Figura 7, apresenta a distribuição da produção de suínos destinados ao abate no ano de 2017, de acordo com o município de origem dos animais. São contabilizadas todas as categorias destinadas ao abate, abatidas em Santa Catarina ou outra unidade da federação.

Figura 7. Distribuição da produção de suínos destinados ao abate em 2017.



Fonte: Elaborado por Epagri/Cepa, a partir de dados da Cidasc.

Legenda: Quanto mais escuro, maior o número de animais produzidos.

Fonte: (EPAGRI, 2017)

3.5 Utilização de antimicrobianos na criação animal

Desde a Segunda Guerra Mundial os antimicrobianos foram utilizados em grande escala para tratamento de doenças humanas. No entanto, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na pecuária tem resultado em uma ameaça cada vez maior para a saúde de humanos e animais.

A penicilina foi amplamente utilizada em humanos durante o período da Segunda Guerra Mundial e da mesma forma, os veterinários utilizaram uma preparação de penicilina para tratar mastite bovina (GUSTAFSON; BOWEN, 1997). Em 1946, melhorias no crescimento em pintinhos foram documentadas após uma alimentação enriquecida com estreptomicina (MOORE *et al.*, 1946). A partir disso, tais melhorias no desempenho de crescimento de frangos e suínos alimentados com clortetraciclina refletiram comercialmente (STOKSTAD *et al.*, 1949); JUKES *et al.*, 1950). A *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso

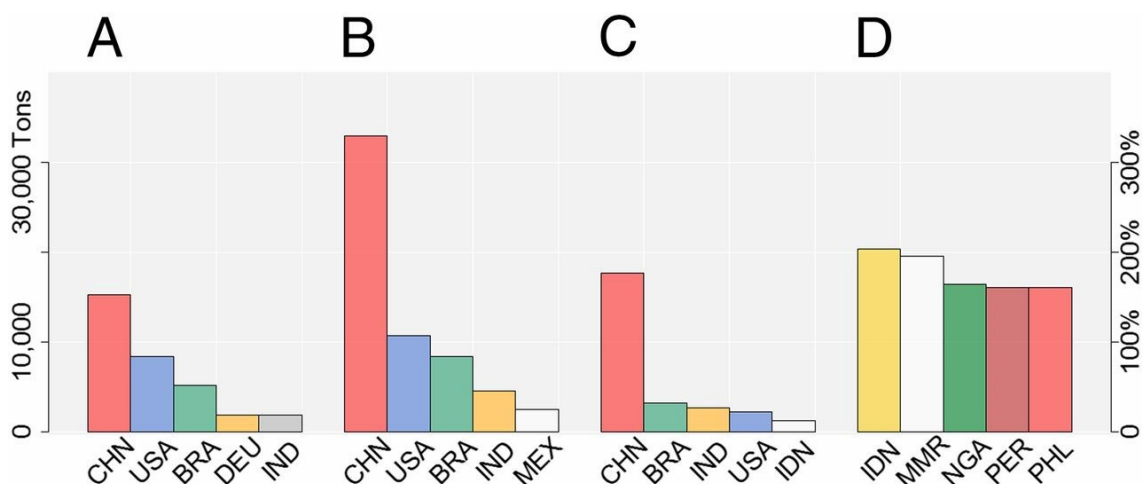
de promotores de crescimento antimicrobianos (*Antimicrobial growth promoters* -AGP) em animais em 1951.

O uso disseminado de antimicrobianos na alimentação animal aumentaram à medida que os custos de fabricação e produção diminuíram. A utilização de doses subterapêuticas aumentaram as taxas de crescimento animal e reduziram a mortalidade dos mesmos (TEILLANT; LAXMINARAYAN, 2015). O consumo de antimicrobianos em animais é estimado em duas vezes maior do que em humanos (WHO, 2014).

Van Boeckel e colaboradores (2015) demonstraram o uso dos antimicrobianos em alimentos de origem animal de acordo com os países. A China é o primeiro país no ranking de uso de antimicrobianos em alimentos de origem animal, com um percentual de 23% na utilização de antimicrobianos na criação animal. Em ordem os demais países que mais usam antimicrobianos na criação animal são: Estados Unidos (13%), Brasil (9%), Índia (3%) e Alemanha (3%) (VAN BOECKEL *et al.*, 2015).

Em 2030, projeta-se que essa classificação seja a China (30%), os Estados Unidos (10%), o Brasil (8%), a Índia (4%) e o México (2%). Entre os 50 países com as maiores quantidades de antimicrobianos usados na pecuária em 2010, os cinco países com os maiores aumentos percentuais projetados no consumo de antimicrobianos até 2030 são provavelmente Indonésia (205%), Mianmar (202%), Nigéria (163%), Peru (160%), Vietnã e Filipinas (157%), conforme dados representados na Figura 8 (VAN BOECKEL *et al.*, 2015).

Figura 8. Uso dos antimicrobianos em alimentos de origem animal de acordo com os países.



(A) Cinco maiores consumidores de antimicrobianos na pecuária em 2010. **(B)** Os cinco maiores consumidores de antimicrobianos na pecuária em 2030 (projetado). **(C)** Maior aumento no consumo de antimicrobianos entre 2010 e 2030. **(D)** Maior aumento relativo no consumo de antimicrobianos entre 2010 e 2030. Legenda: CHN:China, EUA: Estados Unidos, BRA: Brasil, DEU: Alemanha, IND: Índia, MEX: México, IDN: Indonésia, MMR: Mianmar, NGA: Nigéria, PER: Peru, PHL: Filipinas. Fonte: (VAN BOECKEL *et al.*, 2015)

A China e o Brasil estão entre os maiores consumidores de antimicrobianos atualmente, mas não são os países com os aumentos projetados mais acelerados no consumo de antimicrobianos. Esses dois países já iniciaram uma mudança em direção a sistemas de produção pecuária mais intensificados, usando antimicrobianos para manter a saúde animal e aumentar a produtividade. O consumo de antimicrobianos por animais nos países do mercado emergente (BRICS- Brasil, Rússia, Índia e China) deve crescer 99% até 2030, enquanto suas populações humanas devem crescer apenas 13% no mesmo período (VAN BOECKEL *et al.*, 2015).

O consumo médio global de antimicrobianos é de 172, 148, 45 mg para cada quilograma de massa de porco, frango e gado, respectivamente. Em 2010, o consumo global total de antimicrobianos em animais para alimentação foi de 63.151 toneladas, com um aumento projetado de 67% em 2030 (VAN BOECKEL *et al.*, 2015). Nos EUA, cerca de 80% de todos os antimicrobianos são usados principalmente em alimentos para animais em doses subterapêuticas, no qual 14.600 toneladas de antimicrobianos foram vendidas para uso em animais em 2012 (FDA, 2010) (FDA, 2014). Anualmente a China é o maior produtor e consumidor do mundo de antimicrobianos e usa cerca de 97.000 toneladas na agricultura animal (HU; CHENG, 2014).

Entretanto, vários países europeus proibiram o uso de certos antimicrobianos na agricultura, através da legislação referente ao controle de resíduos de antimicrobianos em animais e seus produtos dados no Conselho da União Europeia Diretiva 96/23 / CE. Doses subterapêuticas de uso de antimicrobianos em alimentos animais foi proibida nos países da União Européia (UE) (VAN BOECKEL *et al.*, 2015).

O uso de antimicrobianos na alimentação animal foi proibida na Suécia em 1985. Na Dinamarca, o uso de avoparcina foi proibido em 1995, seguido pela proibição da virginiamicina em 1998. A UE proibiu o avoparcin em 1997 e quatro promotores de crescimento, espiramicina, fosfato de tilosina, virginiamicina e bacitracina de zinco. A Indústria alimentar dinamarquesa parou o uso de todos os antimicrobianos como promotores de crescimento em 1998 (WILLIS, 2000).

Em 2005, a Food and Drug Administration (FDA) proibiu o uso de enrofloxacin em animais para alimentação devido ao níveis aumentados de *Campylobacter* spp. resistentes às quinolonas (HUYGHEBAERT; DUCATELLE; IMMERSEEL, 2011). O uso de quinolonas em animais foi proibido pela Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicamentos Veterinários em 2004 (CHENG *et al.*, 2012).

No entanto, apesar das proibições nestes países, a maioria dos antimicrobianos ainda está sendo usada em animais para tratamento e/ou prevenção de doenças e promoção do crescimento em muitos países (MUAZ *et al.*, 2018). Nos últimos anos, a resistência aos antimicrobianos se tornou uma das áreas de prioridades para as autoridades legislativas. Como por exemplo, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) coleta e examina os dados sobre resistência aos antimicrobianos da EU e apresenta-os em relatórios oficiais. A OMS publicou uma lista de antimicrobianos que não podem ser utilizados em animais. Sendo as cefalosforinas, glicopeptídeos, macrolídeos, polimixinas e quinolonas, os fármacos que estão na lista de antimicrobianos de importância crítica (MUAZ *et al.*, 2018).

3.6 Resistência aos antimicrobianos na criação animal

3.6.1 Cenário atual

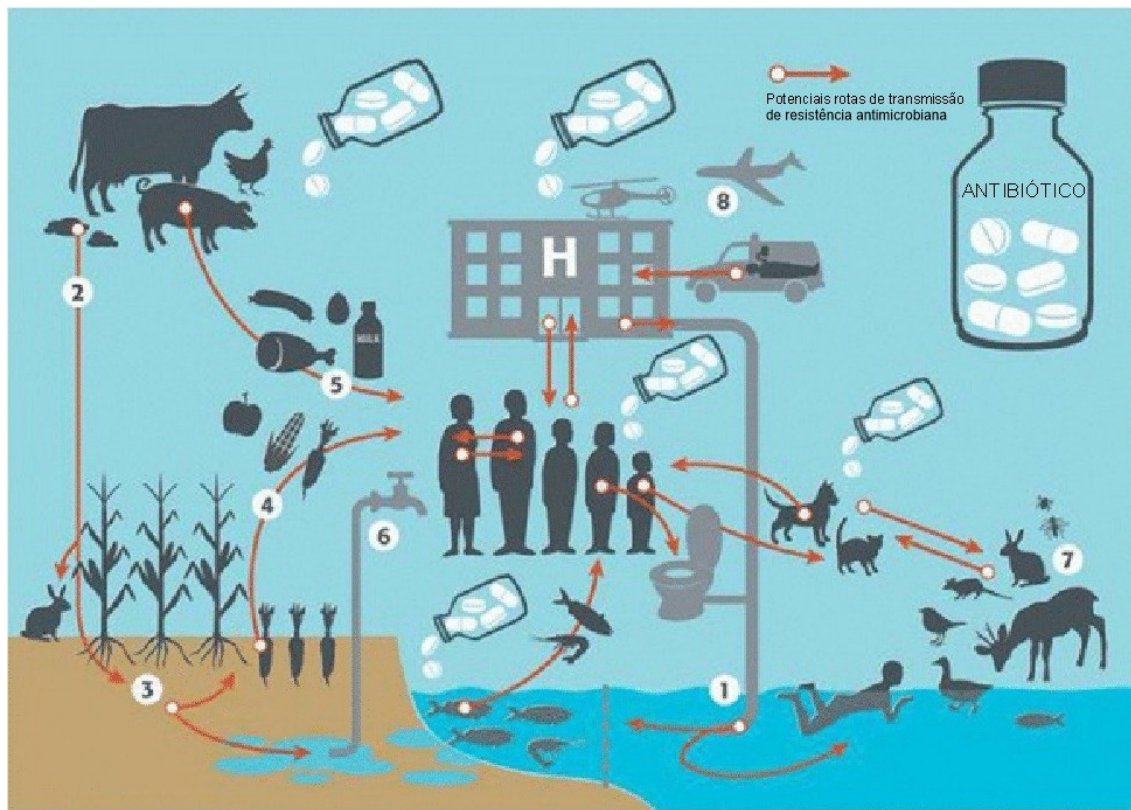
O uso em grande escala de antimicrobianos na produção animal tem consequências importantes, visto que promove a resistência antimicrobiana, uma ameaça tanto para a saúde humana quanto animal.

Através da resistência antimicrobiana, é possível observar uma associação da saúde animal e infecções resistentes em humanos (Figura 9). Patógenos resistentes a múltiplos medicamentos surgiram em todo mundo na década de 1980. Nos EUA, mais de 2 milhões de infecções e 23.000 mortes são atribuídas a MRA (HAMPTON, 2013). Na Europa, 25.000 pessoas morrem anualmente em consequência de infecções por bactérias multirresistentes a um custo de € 1,5 bilhões (DAVIES *et al.*, 2013). A resistência aos agentes antimicrobianos é um fator significativo e considerada uma ameaça global à saúde pública (WHO, 2014).

Vários estudos comprovam a presença de diferentes genes de resistência em alimentos de origem animal, como descrito por Bahr Arias e colaboradores (2012). Os autores apontam que as cepas resistentes aos antimicrobianos mais conhecidas são cepas de *Salmonellas* spp., *Campilobacter* spp. e *Escherichia coli* resistentes e, que geralmente, a infecção de pacientes por esses microrganismos ocorre através do consumo de alimentos de origem animal contaminados.

Sabe-se que os carbapenêmicos não são usados em animais produtores de alimentos. Porém, é observado a presença de plasmídeos com genes codificadores de carbapenemases. Além disso, há estudos, apesar de limitados, que demonstram a presença de plasmídeos contendo genes de resistência aos carbapenêmicos, como *bla*NDM-1 em porcos, *bla*NDM-17 em galinhas da China e *bla*OXA-181 em porcos da Itália (BACANLI; BACSARAN, 2019).

Figura 9. Diagrama representativo das rotas de transmissão da resistência antimicrobiana entre animais, ambiente e humanos.



Legenda: Os genes de resistência aos antimicrobianos se espalham no meio ambiente por meio de diferentes rotas, como sistemas de saneamento de água (1), as estações de tratamento de águas residuais não eliminam totalmente as bactérias resistentes aos antibióticos antes de liberar água no meio ambiente. Outra via comum é por meio da aplicação de manuseio em campos com culturas cultivadas (2), onde bactérias resistentes aos antibióticos podem se desenvolver prontamente nas plantas (3). A incorporação dessas bactérias resistentes pode então acontecer por meio da cadeia alimentar, quando os humanos posteriormente consumirem essas plantas (4) ou a carne contaminada de animais e peixes que abrigam bactérias resistentes (5). As bactérias podem atingir facilmente as reservas de água, a infraestrutura de distribuição de água também é uma rota potencial para a disseminação desses germes (6). Mesmo animais selvagens, insetos e outros animais são portadores potenciais de resistência antimicrobiana (7). Turismo, migrações e importação de alimentos (8) são, no entanto, relatadas como a maneira mais rápida de espalhar cepas resistentes de bactérias através das fronteiras. No nível das unidades de saúde, as bactérias resistentes podem se espalhar pelo contato entre pacientes ou com a equipe de saúde, ou através de superfícies e dispositivos médicos contaminados.

Fonte: Adaptado de (HARBARTH *et al.*, 2015)

3.6.2 Estudos realizados

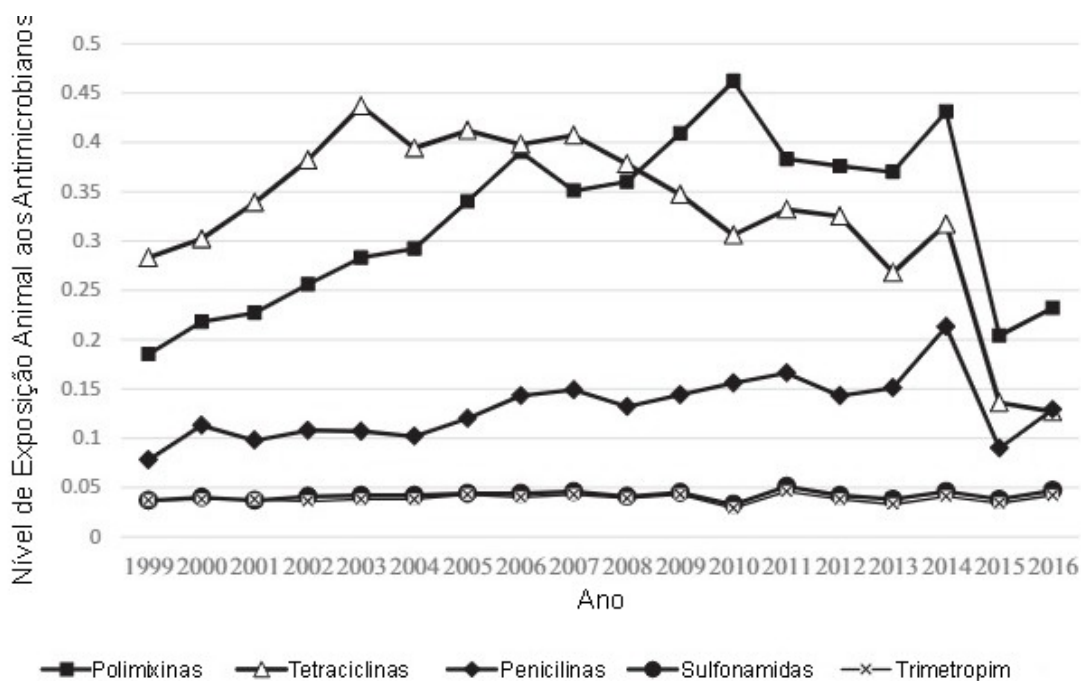
3.6.2.1 Estudos sobre o uso de antimicrobianos na criação de aves

Os antimicrobianos utilizados na criação de aves, geralmente são administrados em todo o rebanho, com a finalidade de tratamento e profilaxia de doenças e promoção do crescimento (ROTH *et al.*, 2019).

O uso de antimicrobianos para prevenção de doenças, é permitido nos grandes países produtores de aves. Sendo esses fármacos aplicados para o tratamento de infecções intestinais, como colibacilose, enterite necrótica e, outras doenças geralmente causadas por *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Clostridium* spp. Essas infecções são de extrema relevância clínica e econômica para cada país produtor (ROTH *et al.*, 2019).

Segundo a revisão global realizada por Roth e colaboradores (2019) é possível observar a evolução nas vendas e prescrições das classes de antimicrobianos em rebanhos de aves, entre 1999 até 2016. Nesse período os rebanhos avícolas foram basicamente tratados com Polimixinas, Penicilinas e Tetraciclina e, em seguida, com Sulfonamidas e Trimetopim, conforme a Figura 10.

Figura 10. Nível de exposição do rebanho de aves aos antimicrobianos de 1999 a 2016.



Fonte: Adaptado de (ROTH *et al.*, 2019)

Em relação ao cenário de estudos, o Brasil, atualmente não possui um laboratório central de referência em microbiologia, portanto, não são realizados monitoramentos da resistência bacteriana presente nas criações de aves. Em geral, o baixo número de estudos, bem como o uso de diferentes números de

isolados em cada estudo e metodologias, não permitem definir a taxa de resistência bacteriana em âmbito nacional. Assim, mostra-se necessário o monitoramento dessas taxas nacionais de forma contínua (ROTH *et al.*, 2019).

As publicações científicas que apresentam os percentuais de resistência bacteriana no Brasil, destacam a presença predominante de *Escherichia coli* nos isolados obtidos em granjas de aves (ROTH *et al.*, 2019). Onde as maiores taxas de resistência bacteriana identificadas foram descritas no estudo de Barros e colaboradores (2012) para lincomicina, eritromicina e ácido oxolínico, com 100, 97 e 88% dos isolados resistentes, respectivamente. O uso da lincomicina é permitido no Brasil, embora eritromicina e ácido oxolínico não sejam, outros representantes de macrolídeos (tilosina e tilmicosina) e quinolonas (halquinol) são permitidos para uso. As taxas de resistência às penicilinas e ampicilinas são de 75 e 65%, respectivamente. Representantes de ambas as classes de antimicrobianos podem ser administrados em aves no Brasil (BARROS *et al.*, 2012).

Outros estudos identificaram variações nas taxas de resistência bacteriana em *Escherichia coli* em amostras de aves, para os antimicrobianos sulfametoxazol e trimetropim. Portanto em um estudo relatou-se que 100% dos 174 isolados testados eram resistentes (G. *et al.*, 2016). Além disso, dois estudos adicionais apresentaram taxas de resistência bacteriana de 27 e 28% em 70 e 120 isolados testado, respectivamente (KORB *et al.*, 2015; ROTH *et al.*, 2019).

Os resultados distintos encontrados para a taxa de resistência bacterianas aos antimicrobianos específicos podem ser justificados pela diferença dos locais e períodos das coletas nos estudos (ROTH *et al.*, 2019).

3.6.2.2 Estudos o uso de antimicrobianos na criação de suínos

Desde o início dos anos 2000, Van den Bogaard e colaboradores (2000) descrevem que bactérias comensais em animais poderiam se tornar um reservatório de genes de resistência bacteriana aos antimicrobianos e, assim, contaminando carnes e produtos derivados destinados a humanos (VAN DEN BOGAARD; LONDON; STOBBERINGH, 2000).

Estudos recentes destacam a importância clínica da presença de isolados de *Escherichia coli* em amostras de criação de suínos (ABUBAKAR *et al.*, 2019), pois é uma das principais causas de diarreia em porcos (leitões e desmamados) em diferentes níveis de intensidade em todo o mundo (ABUBAKAR *et al.*, 2019). Em leitões, diarreia por *Escherichia coli* pode ser seguida por diarreia terminal e septicemia, que é uma causa importante de perda econômica para os produtores de suínos em todo o mundo (TOLEDO *et al.*, 2012). Portanto antimicrobianos são frequentemente utilizados no tratamento e controle das infecções entéricas em suínos (ABUBAKAR *et al.*, 2019).

Estudos apontam que a administração de antimicrobianos aumentam o risco de resistência antimicrobiana (BUROW *et al.*, 2014). Outros fatores, como estresse de temperatura, aglomeração e gestão também parecem contribuir para a presença de resistência bacteriana em isolados bacterianos de animais (ABUBAKAR *et al.*, 2019).

Relatórios recentes indicam um aumento da prevalência de *Escherichia coli* resistentes aos antimicrobianos (LUPPI *et al.*, 2015) e as infecções causadas pelas bactérias resistentes, geralmente não respondem ao tratamento por antimicrobianos específicos. Isso pode estar associado ao aumento proliferação de patógenos bacterianos, taxas de reinfecção, cronicidade e infecções oportunistas com organismos resistentes (ABUBAKAR *et al.*, 2019).

Segundo o trabalho realizado por Abubakar e colaboradores (2019), que comparou a presença de resistência bacteriana entre os grupos de suínos em uso de antimicrobianos e o grupo sem uso desses fármacos, em fases distintas de crescimento desses animais, foi observado maiores taxas de resistência à todos os antimicrobianos testados para o grupo de animais que não faziam uso de antimicrobianos, ou seja, o estudo mostrou que os genes de resistência em porcos podem estar presentes em qualquer estágio de crescimentos desses animais, com ou sem administração direta de antimicrobianos para profilaxia, sendo o genes *tet* os mais presentes nas amostras, devido aos altos níveis de uso de tetraciclinas (ABUBAKAR *et al.*, 2019).

Em estudo realizado, por Brisola e colaboradores (2019) com amostras de suínos e ambientais (água e solo) do Oeste do estado de Santa Catarina, observou-se que aproximadamente um terço das amostras de água estavam

contaminadas com material fecal, constatando que 75,94% delas eram impróprias para consumo humano, demonstrando uma elevada carga microbiológica nos mananciais dessa região. Vários fatores podem contribuir para a contaminação da água nas propriedades rurais, como o manejo ineficiente de dejetos humanos e animais, bem como a falta de higiene ou proteção contra roedores e animais silvestres (BRISOLA *et al.*, 2019)

A presença de amostras infecciosas de *Escherichia coli* em suínos pode ser facilmente explicada pelo fato dessa bactéria fazer parte da microbiota intestinal, responsável pela manutenção do equilíbrio intestinal, com exceção de algumas cepas patogênicas que são classificadas de acordo com alguns traços de virulência. Alguns estudos demonstraram a capacidade desta bactéria de sobreviver e crescer por longos períodos de tempo no ambiente (BRADFORD *et al.*, 2013).

Outro ponto em destaque do trabalho, é o percentual de *Escherichia coli* multirresistente, já que um terço dos isolados apresentou resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos e 78% das cepas multirresistentes apresentaram valores do Índice de Resistência Bacteriana Múltipla ¹ acima de 0,2, representando alto risco de transmissão para humanos. A resistência ao antimicrobiano sulfa-metoxazol associado ao trimetoprim foi amplamente relatada em casos de diarreia em leitões causada por *Escherichia coli* e, também em *Escherichia coli* isoladas de suínos e meio ambiente. Observou-se também, que a colistina tem sido amplamente utilizada como promotor de crescimento, porém detecções recentes de genes *mcr-1* conferindo resistência bacteriana a este antimicrobiano mediada por plasmídeos levaram o governo brasileiro a proibir o uso. Por fim, foi identificada a presença de 10 isolados positivos para ESBL dos 135 isolados testados (BRISOLA *et al.*, 2019).

Portanto, estes estudos possibilitam a compreensão da disseminação dos mais diversos genes de resistência bacteriana dentro da criação animal, onde o tratamento clínico apresenta uma influência direta para o surgimento de isolados resistentes em amostras advindas diretamente ou indiretamente de animais.

¹ O Índice de Resistência Bacteriana Múltipla foi calculado conforme a metodologia descrita por Kruperman (1983), sendo este índice determinado pela relação entre o número de antimicrobianos que a amostra é resistente e o número total de antimicrobianos testados (AMARANTE *et al.*, 2018).

3.7 Efeitos dos Resíduos de Antimicrobianos em Alimentos

Um dos efeitos adversos mais importantes do uso de antimicrobianos em alimentos são as reações alérgicas. Muitos dos medicamentos e antimicrobianos podem provocar reações alérgicas. A maioria dos estudos relatam caso de hipersensibilidade à penicilina, aminoglicosídeos e tetraciclina. Infelizmente, os efeitos de longo prazo do uso de antimicrobianos na saúde humana ainda não são conhecidos. Os β -lactâmicos são conhecidos como antimicrobianos menos tóxicos. No entanto, conclui-se que eles foram responsáveis pela maioria das reações alérgicas relatadas a antimicrobianos em humanos (BACANLI; BACSARAN, 2019)

Reações como alergia, erupções cutâneas e dermatite fototóxica foram relatadas dependendo do uso de tetraciclina. A estreptomicina tem efeitos colaterais importantes nos mecanismos vestibulares do ouvido interno, este efeito colateral pode causar a perda do equilíbrio. Certos macrolídeos podem ser responsáveis por lesão hepática causada por uma resposta alérgica específica a células hepáticas modificadas com metabólitos de macrolídeos (BACANLI; BACSARAN, 2019)

Porém, o efeito adverso mais importante dos resíduos de antimicrobianos é a transferência de genes de resistência presentes em determinadas bactérias e que devido às suas propriedades móveis de resistência, podem infectar humanos e outros animais. A transferência pode ocorrer através da cadeia alimentar e/ou tratadores de animais (BACANLI; BACSARAN, 2019).

O trabalho realizado por Ryu e colaboradores (2012) descreve esta transferência direta dos genes de resistência bacteriana através da cadeia alimentar, através da análise de peixes e frutos do mar comercializados. Nesse estudo, foi obtido um total de 179 isolados de *Escherichia coli* (microrganismo predominante) os quais foram recuperados das 2663 amostras de peixes e frutos do mar (74 de 971 peixes, 57 de 834 crustáceos, 41 de 652 moluscos e 7 de 206 crustáceos) (RYU *et al.*, 2012).

Foi observada resistência bacteriana à tetraciclina (30,7%), estreptomicina (12,8%), cefalotina (11,7%), ampicilina (6,7%), trimetoprima / sulfametoxazol (6,7%), ticarcilina (6,1%), ácido nalidíxico (5,6%) e canamicina (

5%). Esses achados estão de acordo com os dados de vários estudos anteriores que revelaram que a resistência à tetraciclina, estreptomicina (aminoglicosídeos) e penicilinas é comum entre isolados de *Escherichia coli* de animais para alimentação. E não foram observadas resistências à amicacina, amoxicilina / ácido clavulânico e cefoxitina (RYU *et al.*, 2012).

Por fim, 70 isolados que eram resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos foram selecionados para a identificação de genes de resistência. quatro dos oito genes de resistência testados (tetB, tetD, aadA, blaTEM) foram identificados. 53 isolados carregavam um ou mais dos genes de resistência analisados. O determinante genético do tetB foi a característica predominante detectada. Entre os 55 isolados de *Escherichia coli* resistentes à tetraciclina, tetB foi encontrado em 29 isolados e tetD em 14 isolados (RYU *et al.*, 2012).

Portanto, é necessário implementar medidas para o uso prudente de antimicrobianos na produção de alimentos e animais, incluindo a aquicultura, para evitar a disseminação de resistência antimicrobiana. E também, propor uma vigilância contínua dessas taxas de resistência bacteriana aos antimicrobianos (RYU *et al.*, 2012).

3.8 Microrganismos resistentes aos antimicrobianos (MRA)

Após a descoberta dos antimicrobianos, foi possível sua comercialização e administração de forma rotineira no tratamento de infecções, o que revolucionou a medicina moderna e mudou o paradigma terapêutico. De fato, os antimicrobianos se tornaram intervenções médicas necessárias para a realização de abordagens médicas complexas. Infelizmente, o aumento acentuado de MRA tem ameaçado a terapêutica para pacientes enfermos. Diante desse fato, a OMS nomeou MRA como uma das dez mais importantes ameaças à saúde pública do século XXI (MUNITA; ARIAS, 2016).

MRA podem apresentar três tipos de resistência: intrínseca, adquirida e adaptativa. A resistência intrínseca compreende a presença de características próprias do microrganismo que limitam a ação dos antimicrobianos. Como exemplo: presença de membrana externa com baixa permeabilidade, ou, presença constitutiva de genes codificadores de enzimas que alteram os

antimicrobianos, observadas em muitas bactérias. O segundo tipo, é a resistência adquirida, em que um microrganismo, inicialmente sensível ao antimicrobiano, pode tornar-se resistente pela incorporação de novo material genético (plasmídeos, transposons, integrons, cassetes gênicos, entre outros.) ou como resultado de mutações. E o terceiro tipo, a resistência adaptativa, a qual envolve um aumento temporário na capacidade de uma bactéria para sobreviver à ação do antimicrobiano devido a alterações na expressão de genes e / ou proteínas, ocasionadas pela exposição a um desencadeador ambiental, por exemplo, estresse, condições de nutrientes, estado de crescimento e níveis subinibitórios dos próprios antimicrobianos (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012).

As infecções causadas por MRA estão associadas a um aumento da mortalidade, em comparação àquelas causadas por microrganismos sensíveis e conseqüentemente acarretam uma carga econômica estimada em mais de 20 bilhões de dólares por ano, apenas nos EUA (MUNITA; ARIAS, 2016). Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças estimam, que pelo menos 23.000 pessoas morrem anualmente nos EUA, por infecções causadas por MRA (CDC, 2013).

3.9 Principais genes de resistência

3.9.1 β -lactamases

A resistência bacteriana pode ser definida como um conjunto de mecanismos de adaptação das bactérias contra os efeitos nocivos ou letais dos antimicrobianos. Um dos primeiros e mais efetivos mecanismos de resistência bacteriana foi a produção de β -lactamases, que são enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico presente no fármaco, assim, inativando o mesmo e impedindo que ele apresente atividade contra as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular bacteriana. Os β -lactâmicos correspondem à classe de antimicrobianos mais prescrita clinicamente, sendo composta por: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (BERTONCHELI, 2008).

Em 1980, Ambler propôs inicialmente, a divisão dessas enzimas em duas classes, de acordo com suas características bioquímicas e pela análise de suas estruturas moleculares (AMBLER, 1980).

A classe A, compreende a maior parte das β -lactamases, as quais possuem um resíduo de serina no sítio ativo e, a classe B, que é caracterizada pela necessidade de íons de zinco como cofator. Posteriormente, as classes C e D foram adicionadas a essa classificação, devido a presença das enzimas do tipo AmpC e as oxacilinasas, embora as mesmas sejam consideradas serino- β -lactamases, apresentavam características distintas das outras classes. (NODARI; BARTH, 2016).

A classificação de Ambler apresenta um viés, devido a baixa correlação com o fenótipo apresentado pelos isolados clínicos analisado. Sendo assim, Bush, Jacoby e Medeiros propuseram, em 1995, uma classificação funcional, ou seja, leva-se em consideração os substratos e os inibidores de cada tipo de enzima e ainda apresenta correlações com os grupos de Ambler (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

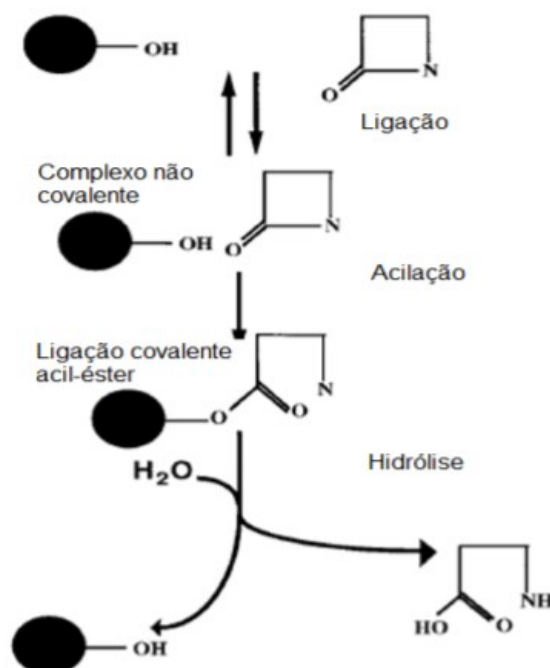
A diversidade das β -lactamases vai além de suas características estruturais e funcionais. Essas enzimas podem estar presentes em componentes genéticos, os quais serão responsáveis pela expressão e disseminação desses mecanismos de resistência. Destacando-se sua presença em componentes genéticos nos microrganismos do grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganella morganii*). Portanto, as cefalosporinasas do tipo AmpC são cromossomais e induzíveis na presença de antimicrobianos como amoxicilina e imipenem. Já o *Acinetobacter baumannii* apresenta oxacilinasas cromossomais que, dependendo do promotor presente, são superexpressos e apresentam atividade contra carbapenêmicos. E por fim, a *Stenotrophomonas maltophilia* é intrinsecamente resistente aos carbapenêmicos, especialmente ao imipenem, devido à produção das carbapenemases cromossomais. Embora a presença de β -lactamases de origem cromossomal interfira na escolha do tratamento com β -lactâmicos, são os genes transferíveis por elementos genéticos móveis que apresentam maior relevância clínica e epidemiológica (NODARI; BARTH, 2016).

3.9.1.1 β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs)

Os β -lactâmicos são os antimicrobianos mais utilizados para o tratamento de infecções bacterianas. A ampla utilização desta classe, principalmente das cefalosporinas de segunda e terceira gerações, para o tratamento de infecções causadas por enterobactérias, foi acompanhada pelo surgimento e disseminação de cepas bacterianas resistentes produtoras de β -Lactamases. As β -Lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel β -Lactâmico presente na estrutura química dos antimicrobianos β -Lactâmicos, com exceção das cefamicinas (cefoxitina, cefotetan) e dos carbapenênêmicos (imipenem, meropenem). Porém, as ESBL (β -Lactamases de Espectro Estendido) podem ser inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (TUMBARELLO *et al.*, 2006). As ESBL são codificadas pelo gene *bla* e são produzidas de forma constitutiva ou induzida. Os genes para ESBL podem ser encontrados no cromossomo bacteriano, plasmídeos transposons e integrons (WELDHAGEN, 2004; BABIC; HUJER; BONOMO, 2006).

As ESBL são semelhantes estruturalmente com a proteína ligadora de penicilina (PLP) que permite a sua ligação aos antimicrobianos, possibilita acilar e hidrolisar o anel β -lactâmico, inativando o fármaco (MASSOVA; MOBASHERY, 1998). O mecanismo de ação, se inicia com a ligação da enzima β -Lactamase ao anel β -lactâmico, através da hidroxila livre na cadeia lateral de um resíduo de serina, formando uma ligação covalente acil-éster. A hidrólise do éster formado libera a enzima ativa e o fármaco é hidrolisado e inativado (Figura 11). A maioria das ESBL utilizam a porção terminal do éster de serina para hidrolisar os β -lactâmicos, porém, algumas ESBL utilizam íons de zinco para realizar a hidrólise (LIVERMORE, 1995).

Figura 11. Mecanismo de ação das β -Lactamases.



Fonte: (ZAMPARETTE, 2014)

3.9.1.2 β -Lactamases de Classe A (Serino-carbapenemases)

3.9.1.2.1 Gene *bla*TEM

TEM-1 é a β -lactamase mais comumente encontrada em bactérias Gram-negativas. Até 90% da resistência à ampicilina em *E. coli* é devido à produção de TEM-1. O gene TEM-1, é responsável pela resistência à ampicilina e penicilina que é vista em *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* em números crescentes. Embora as β -lactamases do tipo TEM sejam mais frequentemente encontradas em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, elas também são encontradas com frequência em outras espécies de bactérias Gram-negativas (ALCOCK *et al.*, 2020).

As substituições de aminoácidos responsáveis pelo fenótipo ESBL agrupam-se em torno do sítio ativo da enzima e alteram sua configuração, permitindo o acesso aos substratos oximiino- β -lactâmicos. A abertura do sítio ativo para substratos de β -lactâmicos, também aumenta a afinidade da enzima aos inibidores de β -lactamase, como o ácido clavulânico. Embora as β -

lactamases resistentes ao inibidor não sejam ESBLs, elas são frequentemente discutidas com ESBLs porque também são derivados das enzimas clássicas do tipo TEM ou SHV.

À princípio, essas enzimas receberam a designação de IRT para β -lactamase TEM resistente ao inibidor, no entanto, todos foram posteriormente renomeados com designações TEM numéricas. Existem pelo menos 19 β -lactamases de TEM resistentes a inibidores distintos. As β -lactamases de TEM resistentes a inibidores foram encontradas principalmente em isolados clínicos de *Escheria coli*, mas também em algumas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* e *Citrobacter freundii* (ALCOCK *et al.*, 2020).

3.9.1.2.2 Gene *blaSHV*

O primeiro gene *blaSHV*-1 foi indentificado na década de 1970 em cepas de *E.coli* e, as β -lactamases de espectro estendido do tipo SHV (ESBLs), codificadas pelo gene *blaSHV*, conferem resistência significativa aos antimicrobianos β -lactâmicos, principalmente para à classe das penicilinas e cefalosporinas (LIAKOPOULOS; MEVIUS; CECCARELLI, 2016).

As enzimas SHV surgiram em *Enterobacteriales*, as quais causam infecções na área da saúde nas última décadas do século XX e, agora são observadas em isolados de diferentes contextos epidemiológicos, tanto em humanos quanto em animais e meio ambiente. A origem provável do gene *blaSHV* provém de uma penicilinase cromossômica de *Klebsiella pneumoniae* e, essas β -lactamases do tipo SHV englobam um grande número de variantes alélicas, incluindo as β -lactamases de espectro estendido (ESBL), não ESBL e várias variantes não classificadas (LIAKOPOULOS; MEVIUS; CECCARELLI, 2016) . Atualmente, as ESBLs do tipo SHV apresentam mais de 140 variantes (LIU *et al.*, 2016a).

As enzimas SHV evoluíram de um espectro estreito para um espectro estendido de atividade hidrolisante, incluindo os monobactâmicos e carbapenêmicos, como resultado de mudanças de aminoácidos, que alteram a configuração em torno do sítio ativo dos fármacos (LIAKOPOULOS; MEVIUS; CECCARELLI, 2016).

As SHV-ESBLs são geralmente codificadas por plasmídeos autotransmissíveis que frequentemente carregam genes de resistência à outras classes de antimicrobianos. Os plasmídeos se espalham pelo mundo através de várias espécies da ordem *Enterobacterales*, o que enfatiza sua importância clínica. (LIAKOPOULOS; MEVIUS; CECCARELLI, 2016).

3.9.1.2.3 Gene *bla*CTX-M

As β -lactamases do tipo CTX-M foram relatadas pela primeira vez na década de 1980. No início eram consideradas uma curiosidade à lista de ESBLs, mas, desde do ano 2000 elas se espalharam por todo o mundo e, agora são consideradas o tipo mais comum de ESBL (BUSH; BRADFORD, 2020).

A origem dessa enzima, é a partir da sua presença em cepas de *Kluyvera* spp., onde genes percursores da enzima do tipo CTX-M foram identificados em cromossomos de *Kluyvera criocrescens* (grupo CTX-M-1), *Kluyvera ascorbata* (grupo CTX-M-2) e *Kluyvera georgiana* (CTX-M-8, CTX-M-25 e CTX-M-9). Plasmídeos, elementos conjugativos e integrons também abrigam os genes *bla*CTX-M e contribuem para a sua disseminação (BUSH; BRADFORD, 2020).

O gene *bla*CTX-M é comumente encontrado em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, mas também são encontradas em outras espécies de *Enterobacterales*, incluindo *Salmonella* spp. tifóide e não-tifóide, *Shigella* spp., *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp. e *Serratia marcescens*, bem como várias espécies de não fermentadores (BUSH; BRADFORD, 2020).

As enzimas do tipo CTX-M hidrolisam cefotaxima e ceftriaxona. Já o gene *bla*CTX-M-15 pode hidrolisar ceftazidima em taxas mais altas do que *bla*CTX-M-3, o que pode ser um fator que contribui para a disseminação bem-sucedida dessa enzima (BUSH; BRADFORD, 2020). Portanto, a partir da sua primeira descrição, o número de variantes de CTX-M aumenta continuamente. Hoje totalizam-se 226 variantes para o gene *bla*CTX-M descritas (NCBI, 2021).

3.9.1.3 β -Lactamase de Classe B (Metallo- β -lactamase)

3.9.1.3.1 Gene *bla*NDM

As bactérias ambientais de importância clínica e não clínica, estão se tornando cada vez mais resistentes aos antimicrobianos convencionais. Há 10 anos, preocupava-se com as bactéria Gram-positivas, particularmente o *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e *Enterococcus spp.* resistente à vancomicina. Porém, agora, os pesquisadores concordam cada vez mais que as bactérias Gram-negativas multirresistentes representam um maior risco à saúde pública. Não apenas o aumento da resistência de bactérias Gram-negativas é mais rápido do que em bactérias Gram-positivas, mas também, há um menor número de novos antimicrobianos e menor desenvolvimento de ativos para bactérias Gram-negativas, que em muitas vezes apresentam ativos com cobertura terapêutica insuficiente para 10-20 anos (KUMARASAMY *et al.*, 2010).

O aumento da resistência em bactérias Gram-negativas é devido, principalmente, aos genes móveis em plasmídeos, que podem se espalhar prontamente através de populações bacterianas (KUMARASAMY *et al.*, 2010).

Recentemente, relatou-se um novo tipo de gene de resistência aos carbapenêmicos, denominado *bla*NDM. O gene *bla*NDM foi identificado em um paciente, que retornou para a Suécia após admissão no hospital em Nova Delhi, na Índia, o qual foi colonizado por *K. pneumoniae* e *Escherichia coli* com *bla*NDM-1 em plasmídeo de tamanho variável, que são facilmente transferidos entre cepas bacterianas *in vitro*. Após, foi realizada uma busca molecular, biológica e epidemiológica para *Enterobacteriaceae* positiva para metalo- β -lactamase de Nova Delhi- 1 (NDM 1), e identificou-se a importação do gene de resistência para o Reino Unido por pacientes que retornavam do subcontinente indiano (KUMARASAMY *et al.*, 2010).

Portanto, as β -lactamases NDM ou metalo- β -lactamases de Nova Delhi são β -lactamases de classe B que conferem resistência a uma ampla gama de antimicrobianos, incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas e penicilinas (ALCOCK *et al.*, 2020).

3.9.2 Carbapenemases

3.9.2.1 Gene *bla*OXA-48

As enzimas oxacilinases (OXA) apresentam a capacidade de hidrolisar a oxacilina de forma mais eficiente do que a benzilpenicilina. Essas enzimas foram reconhecidas pela primeira vez nas décadas de 1960 e 1970 e mostraram atividade hidrolítica contra as penicilinas e a oxacilina. Posteriormente, foram descritas algumas enzimas OXAs que também inativam as cefalosporinas e carbapenêmicos. Atualmente, mais de 750 tipos de OXAs foram relatados (PITOUT *et al.*, 2019).

As enzimas OXAs hidrolisam antimicrobianos β -lactâmicos por um método único que apresenta uma lisina carbamilada. As enzimas OXAs usam esta lisina carbamilada para ativar e ancorar o sítio ativo da serina, removendo os obstáculos estéricos da via da molécula de água e levando a uma ligação mais forte e com a hidrólise mais eficiente de agentes β -lactâmicos (PITOUT *et al.*, 2019).

Atualmente há uma grande importância clínica na presença de atividades de carbapenemases através do gene *bla* OXA-48. A vigilância genômica global e os estudos clínicos, bem como vários relatos de casos, sugerem que *Enterobacterales* com carbapenemases (*bla*OXA-48) são endêmicos em certas partes do mundo e estão sendo introduzidos regularmente em regiões não endêmicas onde são responsáveis por surtos nosocomiais. A detecção laboratorial de *Enterobacterales* com carbapenemases (*bla*OXA-48) é um desafio para alguns laboratórios clínicos, especialmente para aqueles que estão situados em regiões de não endemicidade. A comunidade médica, em geral, deve estar ciente da ameaça iminente que é representada por carbapenemases *bla*OXA-48 (PITOUT *et al.*, 2019).

3.9.2.2 Gene *bla*KPC

Os carbapenêmicos são considerados os antimicrobianos mais potentes contra infecções causadas por bactérias Gram-negativas devido à sua elevada

afinidade pelas PBPs (*Penicillin-binding proteins*), maior estabilidade perante as β -lactamases e pela excelente permeabilidade através da membrana externa bacteriana (WOODFORD *et al.*, 2004). No entanto, nos últimos anos, o isolamento de bactérias Gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos vêm se tornando mais frequente. Em enterobactérias, a resistência a esses antimicrobianos é justificada pela produção de carbapenemases. As carbapenemases do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase), são enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (ROCCHETTI, 2010). Atualmente, totalizam-se 73 variantes para o gene *blaKPC* descritas (NCBI, 2021).

As carbapenemases configuram-se como as β -lactamases de extrema relevância clínica para Enterobactérias, devido à presença de enzimas que proporcionam um elevado poder hidrolítico e, assim, fazendo com que os isolados produtores sejam resistentes não somente aos carbapenêmicos, mas a todas as subclasses de β -lactâmicos. Essas enzimas são classificadas nas classes A, B e D de Ambler, ou nos grupos 2df, 2f e 3 de Bush e Jacoby. As carbapenemases são epidemiologicamente importantes, em razão da presença de elementos genéticos móveis, os quais apresentam codificadores para essas enzimas e, assim propiciando os mais diversos contextos genéticos para a disseminação desses genes de resistência (NODARI; BARTH, 2016).

3.9.3 Fosfoetanolamina transferase

3.9.3.1 Gene *mcr*

A colistina pertence à família das polimixinas, polipeptídeos catiônicos, com amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-negativas, incluindo a maioria das espécies da ordem *Enterobacterales*. As duas polimixinas atualmente em uso clínico são a polimixina B e a polimixina E (colistina), que se diferenciam apenas por um aminoácido e têm atividade biológica comparável (LIU *et al.*, 2016b).

A presença do gene *mcr* confere resistência às polimixinas, através da presença da enzima fosfoetanolamina transferase, a qual adiciona um grupamento fosfatidiletanolamina no lipídeo A (componente dos lipopolissacarídeo da bactéria- LPS), diminuindo a carga elétrica negativa do LPS e diminuindo a afinidade pelo antimicrobiano. Esse mecanismo de resistência à polimixina é mediado cromossomicamente (LIU *et al.*, 2016b).

No entanto, foi descrito pela primeira vez por um grupo de pesquisa na China no final de 2015 , a presença do gene *mcr-1* (que confere resistência à colistina) mediado por um plasmídeo, (LIU *et al.*, 2016b). Portanto, a transferência do gene *mcr-1* mediada por um plasmídeo, permite que uma variedade de bactérias seja resistente à colistina, o que representa um grande desafio à saúde pública. Desde a sua identificação, o gene *mcr-1* foi relatado em mais de 30 países ou regiões, abrangendo 5 continentes (LEI *et al.*, 2019).

4. METODOLOGIA

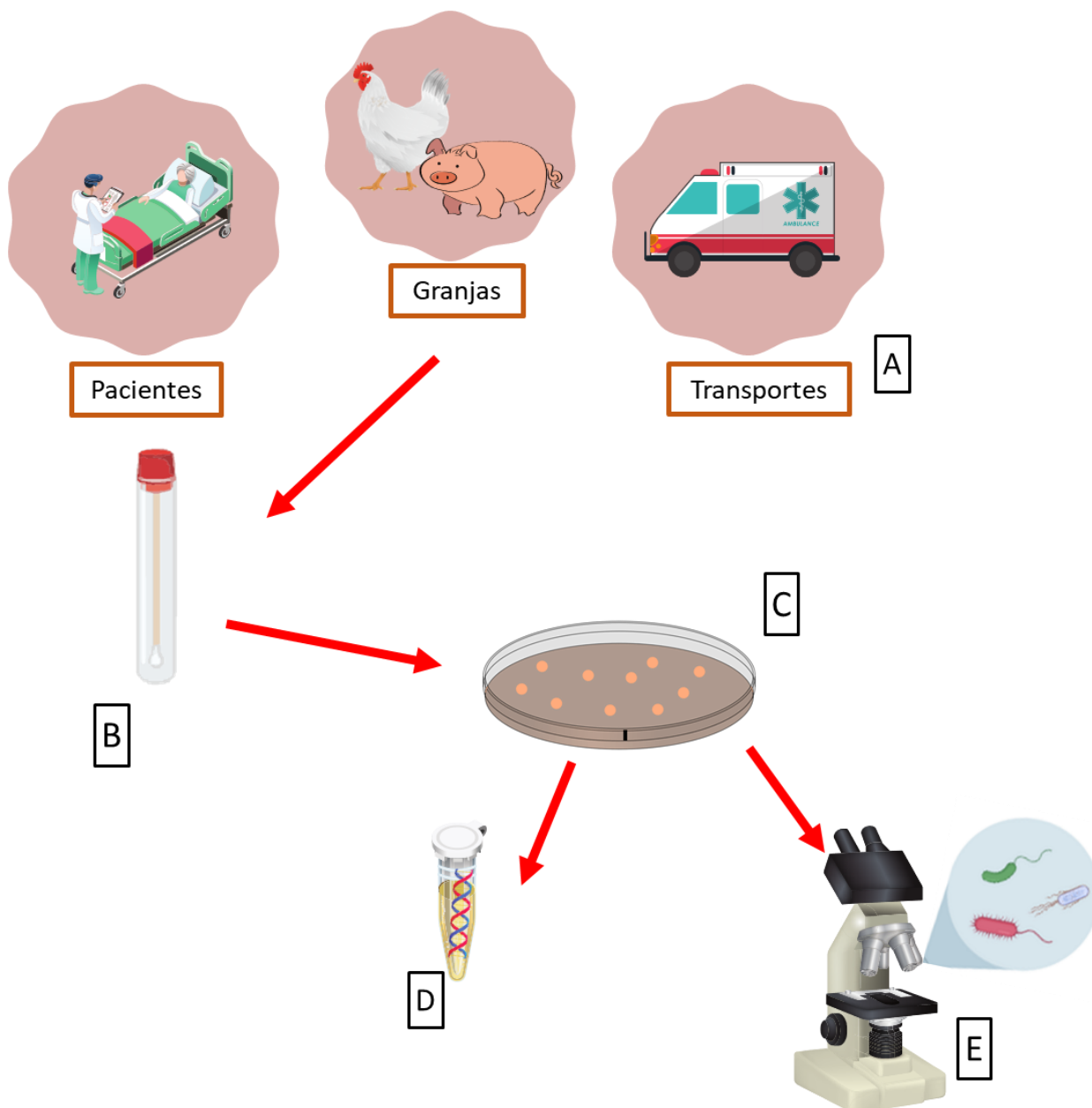
4.1 Estratégia

O projeto apresenta como estratégia principal, a análise da circulação de genes de resistência bacteriana em diversos meios sociais, como o ambiente hospitalar e o meio agrícola (granjas de aves e suínos). Para isso, foram adotadas metodologias para a obtenção e análise dessas amostras obtidas nos diferentes ambientes (hospital, pacientes, transportes e granjas).

No presente trabalho foram analisados apenas os isolados bacterianos Gram-negativos obtidos a partir das amostras de *swabs* coletadas em transportes de cidades do Oeste de Santa Catarina, que serviram especificamente aos pacientes e seus familiares para chegarem ao Hospital Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU). Amostras de pacientes internados (fezes, retal e leito), os quais eram oriundos de pacientes das cidades do Oeste de Santa Catarina e amostras de dejetos de granjas de aves e suínos de determinadas cidades do Oeste de Santa Catarina.

Após a obtenção das amostras, inicialmente realizou-se o isolamento das colônias de bactérias em cada amostra obtida, a partir do crescimento em meios de cultura. Em seguida, com esses isolados foi realizada a triagem por testes bioquímicos, a confirmação da identificação pela metodologia MALDI-TOF, o Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA), identificação pela metodologia MALDI-TOF, a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), a identificação de genes de resistência antimicrobiana específicos por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As metodologias utilizadas estão ilustradas na Figura 12.

Figura 12. Fluxograma metodológico para o trabalho realizado.



(A) Ambientes de coleta (pacientes, granjas e transportes); (B) Amostras obtidas em *swabs*; (C) Isolamento das colônias bacterianas presentes em cada amostra obtida; (D) Extração do DNA total de cada isolado e realização da PCR para genes de resistência; (E) identificação presuntiva, identificação por MALDI-TOF, TSA e CIM das colônias de interesse. Fonte: autora.

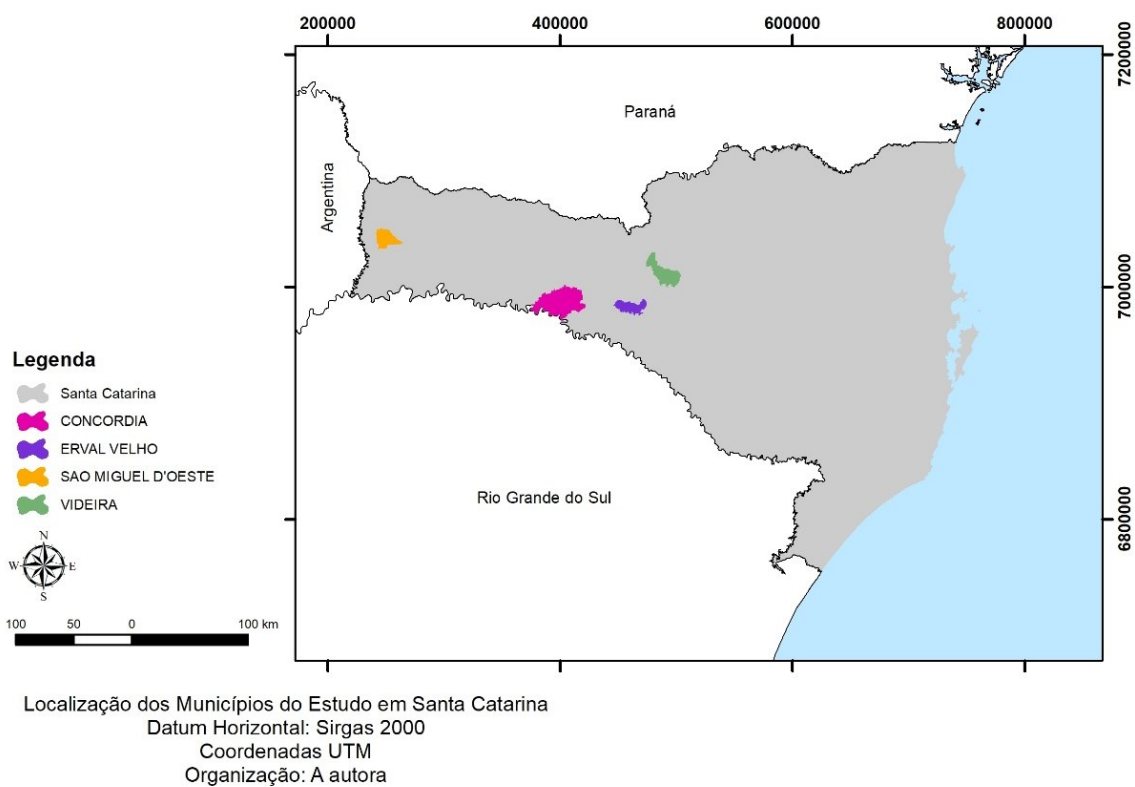
4.2 Obtenção das amostras

Para compreensão do conceito *One Health* dentro do presente estudo, foram obtidas várias amostras em diferentes ambientes, como amostras de pacientes internados em um hospital, dos transportes desses pacientes e de ambientes de criação de animal. Assim, sendo possível correlacionar o ambiente hospitalar e de criação animal com a disseminação dos diferentes genes de resistência bacteriana aos antimicrobianos.

4.2.1 Amostras de transportes

O estudo proposto baseia-se na análise de amostras de *swabs* provenientes de veículos de transporte de pacientes vindos do Oeste de Santa Velhor, Videira, São Miguel do Oeste e Concórdia (Figura 13) e, as respectivas amostras adquiridas foram processadas no Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA).

Figura 13. Localização dos municípios das amostras de transportes do estudo.



Fonte: autora.

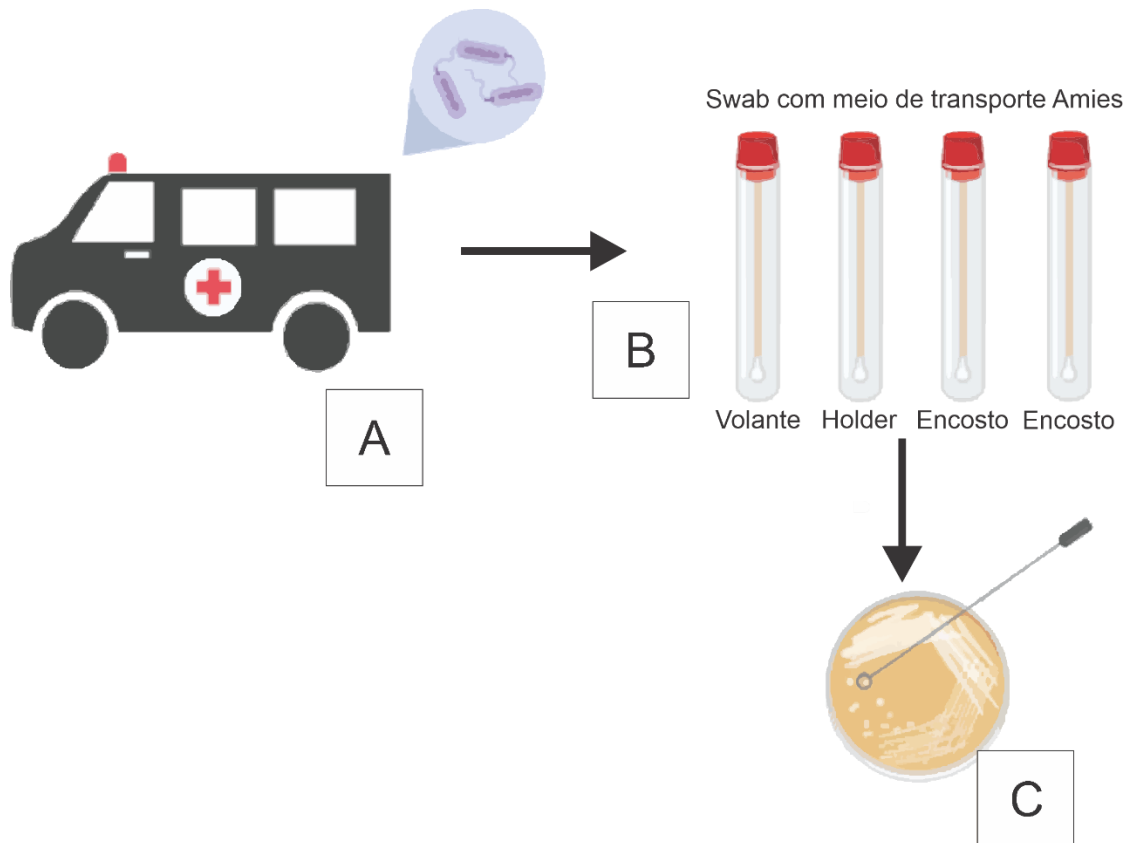
Os transportes destes municípios foram selecionados, pois a atividade agropecuária é responsável por boa parte de sua produção econômica, de forma que a maioria dos pacientes usuários dos transportes são agricultores e trabalham diretamente com animais. Esse fato possibilita melhor relação com os demais dados coletados do projeto principal vinculado, cujos pacientes são moradores das mesmas cidades.

Foi escolhido o *swab* com o meio de transporte Amies ®COPAN ITALIA para realizar o procedimento de coleta. Todas as coletas foram realizadas durante o mês de fevereiro de 2020.

A coleta foi padronizada a partir da passagem dos *swabs* sobre as superfícies determinadas (volante, encostos e do apoio para entrar no veículo - “*holder*”), através de dez passagens de cada lado da ponta do *swab* sobre o local. Foi utilizado 1 *swab* para cada coleta do volante e *holder* e, para a coleta dos encostos foram utilizados 2 *swabs* distintos. As amostras referentes aos encostos foram coletadas em duplicata devido a quantidade de encostos presente nesses veículos.

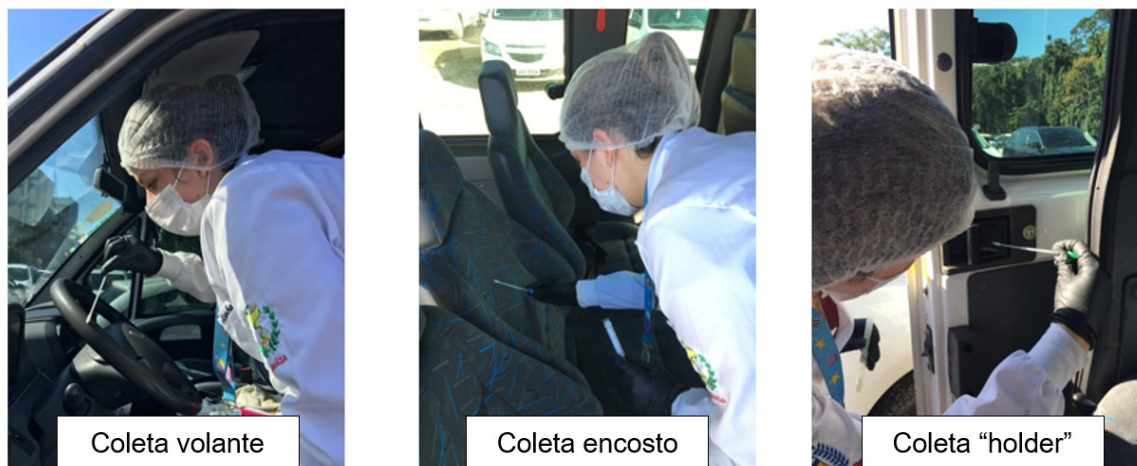
Previamente à coleta, ambos os *swabs* foram umedecidos com soro fisiológico estéril (ampolas individuais). Após a coleta, os *swabs* com o meio de transporte Amies foram armazenados a -80°C, para a sua utilização em estudos seguintes. A metodologia utilizada está ilustrada no fluxograma apresentado na Figura 14. Os momentos de coleta são ilustrados na Figura 15.

Figura 14. Fluxograma metodológico desenvolvido para a coleta dos transportes.



(A) Transportes de pacientes de cidades do Oeste para Florianópolis; (B) Coleta de *swabs*; (C) Isolamento, identificação presuntiva, identificação por MALDI-TOF, TSA e MIC das colônias de interesse. Fonte: autora.

Figura 15. Imagens do procedimento de coleta com *swabs* dos transportes.



Fonte: autora.

4.2.2 Amostras de pacientes

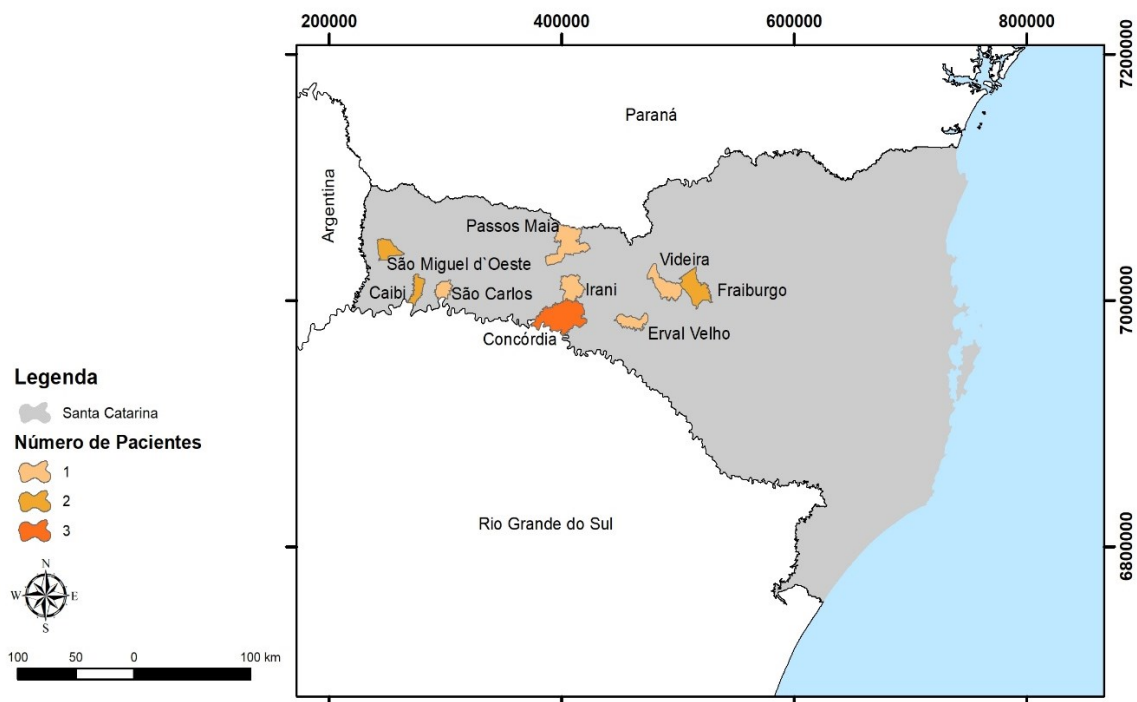
Todos os procedimentos de coleta das amostras de pacientes foram realizados por outro membro da equipe de pesquisa. A coleta das amostras de pacientes foi realizada de janeiro à maio de 2019, a qual se apresentou em 3 etapas distintas; triagem, recrutamento e coleta dos pacientes.

Triagem dos pacientes: Desenvolveu-se um sistema interno em parceria com o Hospital Universitário- UFSC, para que a triagem dos pacientes fosse realizada de forma integrada com todos os setores de internação do hospital. Esse sistema é composto pela descrição de cada paciente internado no hospital e os mesmos, foram ordenados conforme suas cidades de origem. Tais dados eram atualizados em tempo real pelos colaboradores do HU e monitorados pelo membro da equipe responsável pelas coletas. De acordo com os objetivos da pesquisa, os critérios de seleção dos pacientes foram baseados na cidade de origem, os quais deveriam ser provenientes de qualquer município pertencente à mesorregião do Oeste do estado de Santa Catarina e que estivessem internados no hospital com limites de 72 horas a partir do momento da internação e 72 horas anteriores ao momento da saída do paciente do hospital. O sistema desenvolvido, foi consultado diariamente e, aqueles pacientes que se encaixavam nos critérios de elegibilidade do projeto, foram convidados a participar da pesquisa.

Recrutamento de pacientes: Após realizar a triagem de cada paciente, conforme os critérios de escolha, os pacientes foram contatados e foi entregue a cada paciente um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) conforme o **APÊNDICE A**, o qual foi aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humano da UFSC (CAA: 10282619.5.0000.0121) e, explicou-se os termos e objetivos, presentes no documento e, possíveis esclarecimentos quanto ao trabalho a ser desenvolvido. Em casos de pacientes analfabetos, o TCLE era lido juntamente com o indivíduo a fim de que houvesse total compreensão da importância do estudo e das consequências de sua eventual participação. A partir do consentimento do paciente, era dado seguimento as demais etapas: a coleta das amostras e dos dados clínicos e farmacoterapêuticos.

Os pacientes recrutados para a pesquisa corresponderam às cidades de; Caibi, Videira, São Miguel do Oeste, Erval Velho, Concórdia, Fraiburgo, Irani, Passos Maia e São Carlos, as quais se localizam na região Oeste do estado de Santa Catarina, totalizando 14 pacientes, conforme ilustrado na Figura 16.

Figura 16. Localização dos pacientes do estudo.



Localização dos Pacientes do Estudo em Santa Catarina
 Datum Horizontal: Sirgas 2000
 Coordenadas UTM
 Organização: A autora

Fonte: autora.

Coleta das amostras: Foram obtidas amostras de fezes, *swab* do leito no momento da internação (com limite de 72 horas a partir do momento da entrada do paciente no hospital) e no momento da alta (com limite de 72 horas anteriores ao momento da saída do paciente do hospital). Caso não fosse possível a obtenção das amostras de fezes, devido ao estado clínico do paciente ou por escolha do mesmo, era proposto ao paciente a possibilidade de realizar, a coleta de *swab* retal. Todas as coletas foram realizadas com o auxílio de um médico ou enfermeiro do Setor de Controle de Infecções Hospitalares (SCIH).

Caracterização das amostras:

1) Swabs

As amostras coletadas em *swab* (retal e leito), foram realizadas utilizando um *swab* flocado composto de material de fibras curtas perpendiculares de Nylon® (COPAN ITALIA, 2016). Os *swabs* nasais e de leito possuíam hastes mais finas e maleáveis para uma melhor coleta. Os *swabs* retais, de outra forma, possuíam hastes mais espessas e rígidas para facilitar a introdução na região de coleta.

As amostras de leitos foram obtidas a partir da aplicação de movimentos repetitivos dos *swabs* nas regiões dos corrimãos, grades laterais e botões de controle para funcionalidades da cama, objetivando a obtenção da máxima quantidade de material microbiológico presente nessas superfícies. As amostras obtidas foram armazenadas em freezer -20 °C para posterior processamento.

A coleta retal foi realizada a partir da introdução do *swab* até o reto do paciente, sendo feitos movimentos circulares na região para a máxima aquisição de material microbiológico. As amostras obtidas foram armazenadas em freezer -20 °C para posterior processamento.

2) Fezes

As fezes foram coletadas pelo próprio paciente em frascos plásticos grandes. Posteriormente, em laboratório, as amostras foram transferidas para frascos estéreis, e mantidas em geladeira a 4 °C, para posterior processamento. Após a análise realizada, o restante das amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C.

4.2.3 Amostras de granjas de suínos e aves

As coletas de granjas de aves foram realizadas por outros membros da equipe de pesquisa. Os quais obtiveram as amostras de efluentes de granjas presentes em cidades da região Oeste de Santa Catarina: Jaborá (2 granjas), Concórdia (1 granja), Xanxerê (2 granjas), Chapecó (1 granja), Capinzal (1 granja) e Joaçaba (2 granjas). Já as coletas de granjas de suínos foram realizadas em; Concórdia (2 granjas), Xavantina (1 granja), Seara (2 granjas), Chapecó (1 granja), Joaçaba (1 granja), Videira (1 granja) e Capinzal (1 granja). Todas as amostras foram coletas em um único período no mês de outubro de 2019. As cidades descritas são ilustradas na Figura 17 e Figura 18.

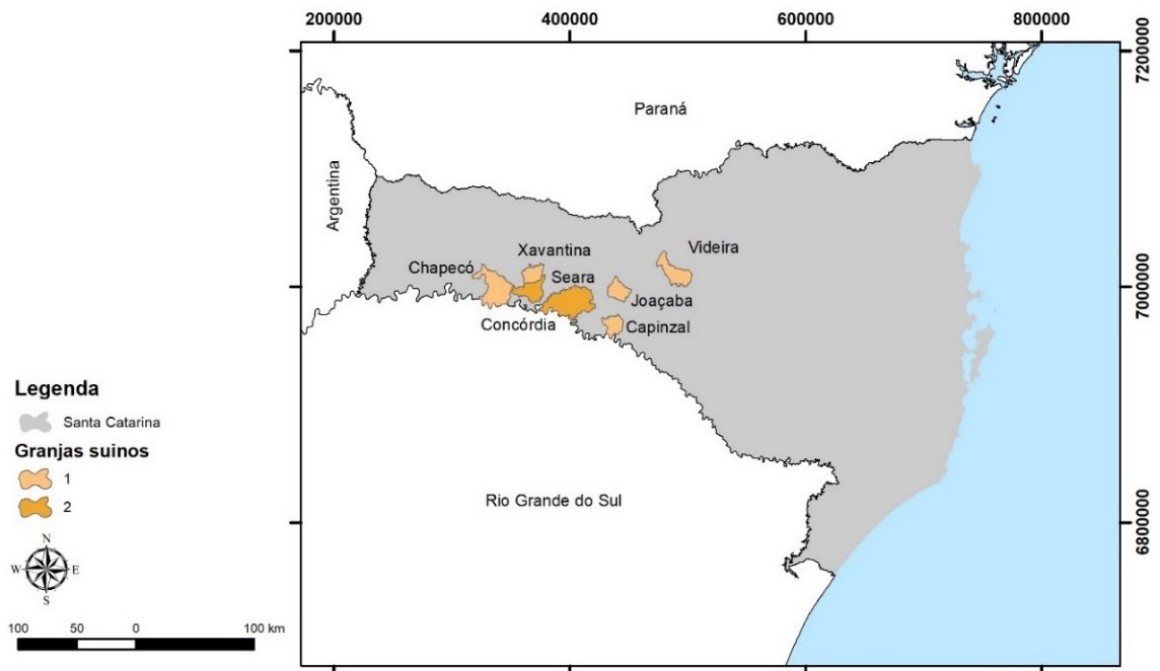
Figura 17. Localização das granjas de aves do estudo.



Localização das Granjas de Aves Estudo em Santa Catarina
 Datum Horizontal: Sirgas 2000
 Coordenadas UTM
 Organização: A autora

Fonte: autora.

Figura 18. Localização das granjas de suíno do estudo.

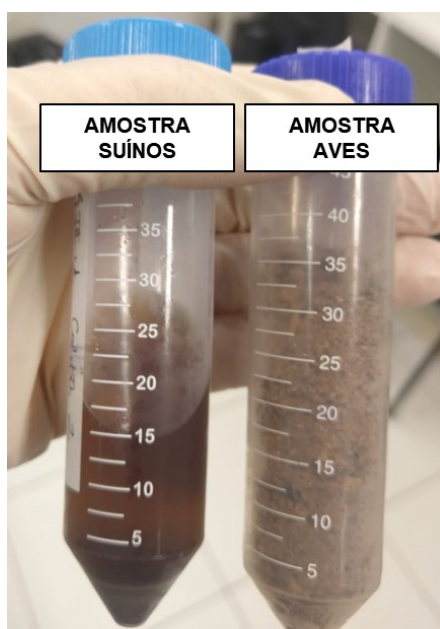


Localização das Granjas de Suínos do Estudo em Santa Catarina
 Datum Horizontal: Sirgas 2000
 Coordenadas UTM
 Organização: A autora

Fonte: autora.

Para estas amostras, foram utilizados tubos do tipo Falcon de 50 mL para auxiliar na coleta, transporte e armazenamento dos dejetos de animais (Figura 19). Para conservação das amostras foi utilizado o meio *DNA Shield* (ZYMO RESEARCH, 2016), o qual o foi adicionado até total submersão da amostra. As amostras obtidas foram armazenadas em geladeira a 4 °C até processamento.

Figura 19. Amostras de granjas de suínos e aves coletadas.



Fonte: autora.

4.2.4 Amostras de suínos de agricultura familiar

Para compor as amostras de dejetos animais, foi realizada uma amostragem de efluentes de granjas de suínos orgânicos, os quais foram coletados de 5 granjas diferentes dentro da cidade de Concórdia, durante dois momentos distintos: Antes da limpeza e após limpeza desses locais de abrigo dos animais. Todas as amostras foram coletas em um único período no mês de outubro de 2019.

Para a coleta, transporte e armazenamento dos dejetos de animais foram utilizados tubos tipo Falcon de 50 mL (Figura 20). As amostras adquiridas foram armazenadas em geladeira a 4 °C até posterior processamento.

Figura 20. Amostras de granjas de suínos orgânicos.



Fonte: autora.

4.3 Técnicas microbiológicas

4.3.1 Isolamento de colônias de interesse clínico - Amostras pacientes e transportes

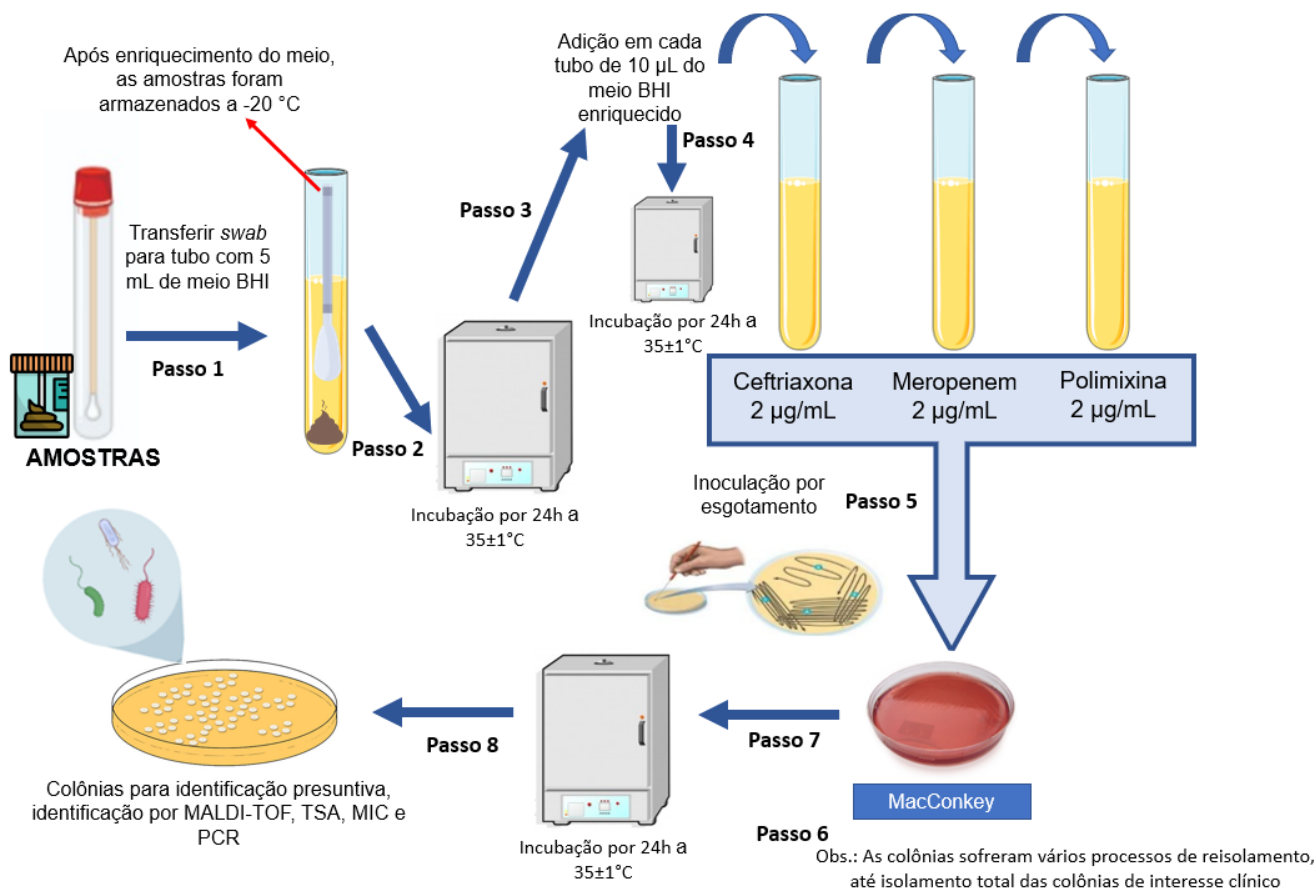
O isolamento de colônias de interesse clínico foi realizado a partir da coleta com o *swab* com o meio de transporte Amies (COPAN ITALIA, 2016) das superfícies das regiões dos veículos das cidades de Erval Velho, Videira, São Miguel do Oeste e Concórdia (volante; encostos e “holder”), totalizando 4 *pool* de amostras. Já para as amostras de pacientes, os isolados foram obtidos a partir dos *swabs* coletados ou, em caso de amostras de fezes, pesou-se 1 g das mesmas. Em seguida, as amostras foram transferidas para um tubo com 5 mL de meio BHI (Kasvi[®]), para enriquecimento do meio e posteriormente tais *swabs* foram congelados para armazenamento. Os meios BHI (Kasvi[®]) enriquecidos de amostra foram incubados por 24h a 35±1°C. Em seguida, foram transferidos 10 µL dessa amostra enriquecida para novos tubos com 2 mL de meio BHI (Kasvi[®]), suplementados com antimicrobianos selecionados, que foram: **ceftriaxona 2 µg/mL** (BioRad[®]), cefalosporina de terceira geração utilizada para a triagem de bactérias produtoras de β-lactamases de espectro estendido

(ESBL); **meropenem 2 µg/mL** (BioRad®), para a triagem de bactérias produtoras de carbapenemases; **polimixina 2 µg/mL** (BioRad®) para triagem de bactérias resistentes às polimixinas. Os tubos foram incubados por 24h a 35±1°C.

As amostras obtidas pela seleção com os antimicrobianos ceftriaxona 2 µg/mL (BioRad®), meropenem 2 µg/mL (BioRad®) e polimixina 2 µg/mL (BioRad®) foram inoculadas em ágar MacConkey (Kasvi®), para a confirmação da presença de bactérias Gram-negativas. As colônias foram submetidas à vários processos de reisolamento, até a obtenção de colônias puras de interesse clínico.

Em seguida, foi realizado o processo de identificação apenas das colônias de interesse clínico, através de provas bioquímicas para uma triagem e utilizando a metodologia MALDI-ToF para identificação definitiva das mesmas. Em seguida, para as mesmas colônias realizou-se o Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA), determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), extração de DNA total e PCR para identificação de genes de resistência antimicrobiana específicos. Todas as colônias Gram-negativas isoladas foram armazenadas à -20°C em meio BHI (Kasvi®) com glicerol 20%. A metodologia descrita é ilustrada pela Figura 21.

Figura 21. Metodologia para o isolamento das colônias de interesse clínico nas amostras de transportes e pacientes.



Fonte: autora.

4.3.2 Isolamento de colônias de interesse clínico – Amostras de granjas

O isolamento de colônia de interesse clínico foi realizado a partir das amostras de dejetos obtidas das granjas de suínos, aves e das granjas de suínos orgânicos.

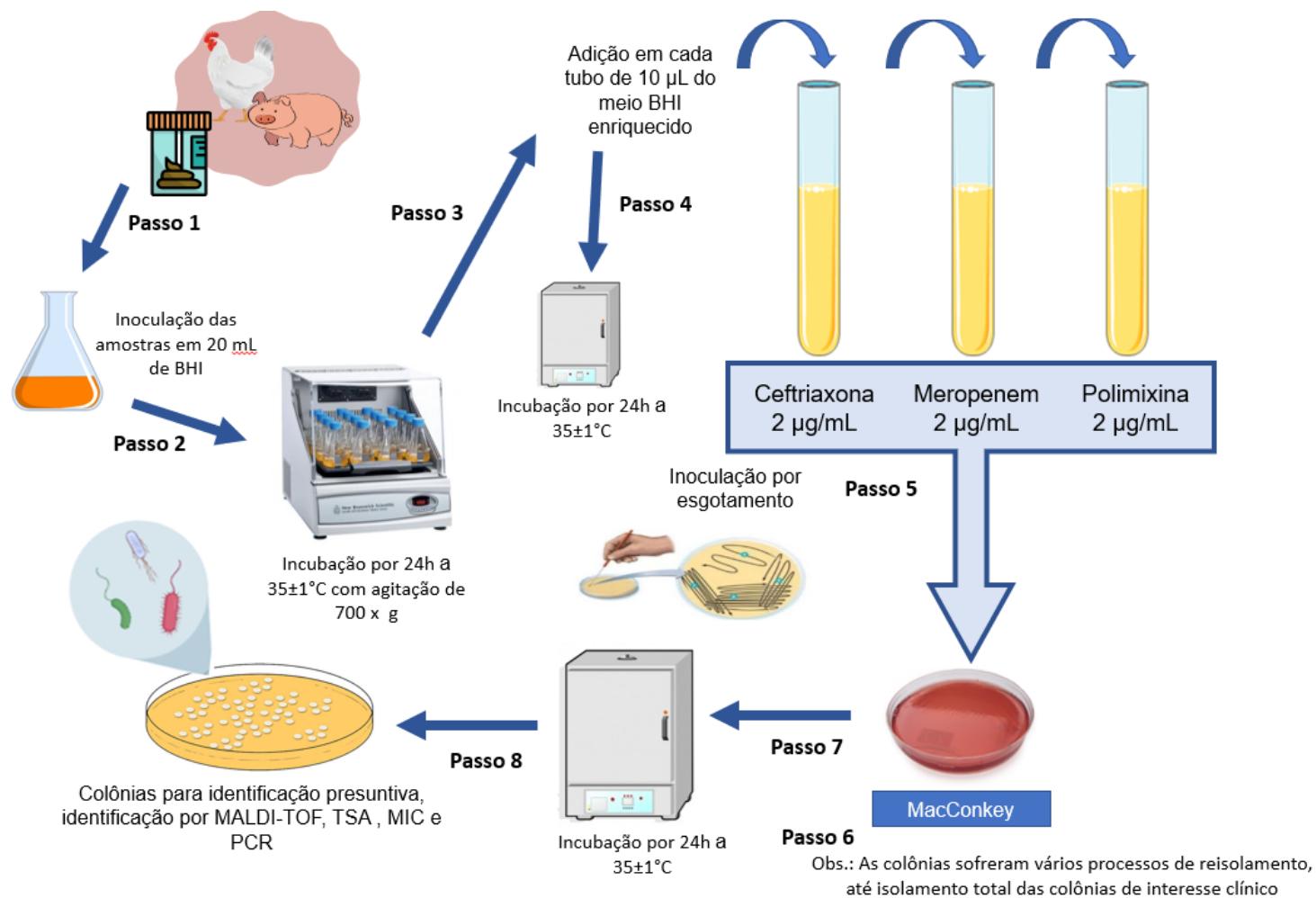
Inicialmente, foi transferido 1 mL de cada amostra de dejetos de suínos e 1 g de cada amostra de cama de palha das aves, para erlenmeyers com 20 mL de meio BHI (Kasvi®) sob agitação de 700 x g, para enriquecimento do meio e, posteriormente, as amostras foram congelados para armazenamento. Os meios BHI (Kasvi®) enriquecidos de amostra foram incubados por 24h a 35±1°C. Em seguida, foram transferidos 10 µL dessa amostra enriquecida para novos tubos com 2 mL de meio BHI (Kasvi®), enriquecido com antimicrobianos selecionados, que foram: **ceftriaxona 2 µg/mL** (BioRad®), cefalosporina de terceira geração utilizada para a triagem de bactérias produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBL); **meropenem 2 µg/mL** (BioRad®), para a triagem de bactérias produtoras de carbapenemases; **polimixina 2 µg/mL** (BioRad®) para triagem de bactérias resistentes às polimixinas. Os tubos foram incubados por 24 h a 35±1°C , totalizando 140 amostras.

As amostras obtidas pela seleção com os antimicrobianos ceftriaxona 2 µg/mL (BioRad®), meropenem 2 µg/mL (BioRad®) e polimixina 2 µg/mL (BioRad®) foram inoculadas em ágar MacConkey (Kasvi®), para a confirmação da presença de bactérias Gram-negativas. As colônias sofreram vários processos de reisolamento, até o isolamento total das colônias de interesse clínico.

Em seguida, foi realizado o processo de identificação apenas das colônias de interesse clínico, através de provas bioquímicas para uma identificação presuntiva e utilizou-se a metodologia MALDI-TOF para identificação definitiva das mesmas. Seguidamente, para as mesmas colônias realizou-se o Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA), determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) para polimixinas, extração de DNA total e PCR para identificação de específicos genes de resistência antimicrobiana. Todas as

colônias isoladas foram armazenadas à -20°C em meio BHI (Kasvi®) com glicerol 20%. A metodologia descrita é ilustrada pela Figura 22.

Figura 22. Metodologia para o isolamento das colônias de interesse clínico nas amostras de granjas.



Fonte: autora.

4.3.3 Triagem dos isolados através de testes bioquímicos

Após o isolamento das colônias de interesse clínico, as mesmas foram triadas através de testes bioquímicos, os quais foram realizados conforme descrito por Oplustil e colaboradores (2019) e a ANVISA (2013). Essa metodologia foi utilizada para auxiliar na realização no Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA). Todos os testes foram realizados no laboratório didático de microbiologia clínica da UFSC.

Foi realizado o processo de triagem de identificação através dos fluxogramas específicos para o microrganismos Gram negativos (Figura 23).

Os testes bioquímicos realizados para microrganismos Gram negativos foram:

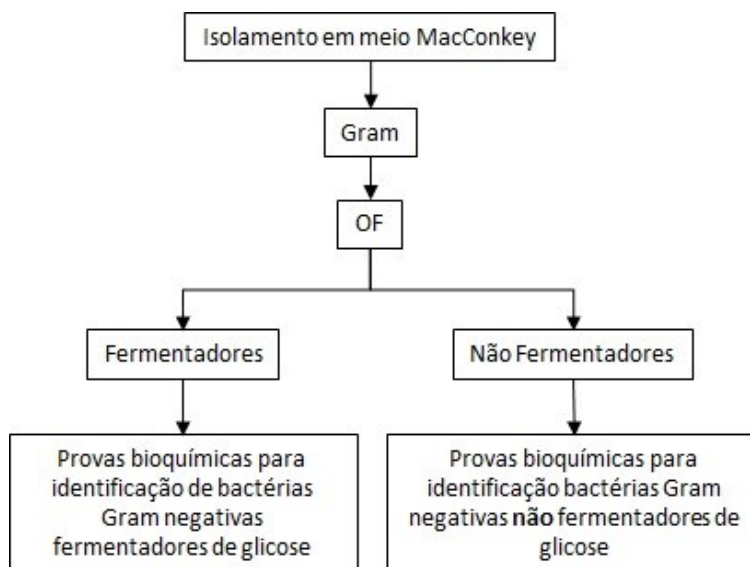
1) Prova da oxidase, apresenta o objetivo de verificar se a bactéria possui a enzima oxidase (hemoproteína que transfere O_2 na última fase da respiração celular). Na presença desta enzima o reativo tetrametilparafenilendiamino é oxidado a indofenol que possui coloração roxo escuro. Portanto, com auxílio de uma alça de plástico esfregou-se a colônia no papel filtro impregnado com o reativo (tetrametilparafenilendiamino) e, realizou-se um controle negativo, para evitar que a coloração formada seja devido à coloração das colônias. A reação positiva se dá pelo aparecimento de uma coloração roxa.

2) OF de glicose, é um meio utilizado para a diferenciação de bacilos Gram-negativos quanto à capacidade do microrganismo em utilizar os carboidratos pela via oxidativa ou fermentativa. Portanto, o meio de OF contém uma alta concentração de carboidratos (1%) e uma pequena concentração de peptona (0,2%), que facilita a utilização dos carboidratos de forma oxidativa pelos bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose. Inicialmente foi avaliada a utilização de glicose para verificar se a bactéria consome a glicose pela via fermentativa ou oxidativa, ou seja, se a bactéria é fermentadora ou não. Portanto, inoculou-se com auxílio de um fio bacteriológico as colônias em 2 tubos de OF de glicose, o tubo da via fermentativa foi coberto com uma espessa camada de óleo mineral (~2mm), pois a fermentação não necessita de oxigênio para ocorrer. Já o tubo da via oxidativa permaneceu sem óleo pois necessita de

oxigênio. Logo, se a bactéria for fermentadora os 2 tubos serão positivos (pois utiliza a glicose na presença ou não de oxigênio) e, se a bactéria for não fermentadora, somente o tubo da via oxidativa será positivo. E se os 2 tubos forem negativos a bactéria é considerada assacarolítica.

Todas as colônias foram identificadas até possível classificação dentro das tabelas de ponto de corte clínico do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST), as quais auxiliaram na leitura dos resultados do TSA.

Figura 23. Fluxograma simplificado para identificação de bacilos Gram Negativo.



Fonte: autora.

4.3.4 Identificação por MALDI-ToF

Para uma identificação mais precisa dos microrganismos presentes em cada amostra, utilizou-se a metodologia MALDI-ToF (*Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization, Time of flight*), com a colaboração do Laboratório do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, localizado em Curitiba- PR.

O aparelho microflex LT® da empresa Bruker utiliza espectrometria de massa para avaliar o perfil proteico da amostra, permitindo a identificação baseada em um banco de dados de perfis conhecidos. A análise consiste na colocação do material biológico (colônias) em uma placa de metal (*Target Plate*), acrescida de 1µL de ácido fórmico 70% e 1µL da matriz polimérica (HCCA) em cada amostra. As placas são secas à temperatura ambiente e, em seguida, introduzidas no equipamento, seguindo as recomendações do fabricante (BRUKER, 2019).

A análise por MALDI-ToF foi realizado para os 173 isolados de bacilos Gram-negativos obtidos. Porém, para algumas amostras não foi possível obter a identificação do microrganismo diretamente da colônia. Para isso, foi realizado o procedimento de extração de proteína em tubo para cada amostra.

A extração de proteína em tubo é realizada segundo as recomendações do fabricante (BRUKER, 2019), onde inicialmente foram adicionados 300 µL de água grau HPLC em um tubo tipo eppendorf (1,5mL) por amostra extraída. Em seguida, foram adicionadas 2 a 3 colônias grandes ao tubo, caso as colônias fossem pequenas foram transferidas mais de 3 colônias. As amostras foram vortexadas por 15 segundos e adicionou-se 900 µL de etanol 100%, as mesmas foram vortexadas por mais 15 segundos. Posteriormente, as mesmas foram centrifugadas a 10.000 x g por 2 min, o etanol foi descartado e o sedimento formado foi centrifugado a 10.000 x g por 1 min. O excesso de etanol foi removido com auxílio de uma pipeta.

Em seguida, foram adicionados 20 µL de ácido fórmico 70% (variando de 10 µL a 50 µL, conforme o tamanho do sedimento). Adicionou-se 20 µL de acetonitrila 100% (mesmo volume adicionado de ácido fórmico). A amostra foi vortexada e, em seguida, centrifugada a 10.000 x g por 2 min. Adicionou-se 1 µL do sobrenadante formado na placa de metal do MALDI-TOF (*Target Plate*) e acrescentou-se 1 µL da matriz (HCCA). Por fim, esperou-se secar a placa em temperatura ambiente e a mesma foi introduzida no aparelho para uma nova leitura (FREIWALD; SAUER, 2009) (BRUKER, 2019).

4.3.5 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

O Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) por disco difusão consiste na observação de halos de inibição formados em placas de meio Muller Hinton com amostras bacterianas inoculadas. Assim, possibilitando a análise do perfil de sensibilidade para os antimicrobianos testados em cada amostra (OPLUSTIL, CARMEN PAZ, ZOCCOLI CASSIA, TOBOUTI NINA, 2019).

O TSA foi realizado para 173 colônias caracterizadas de acordo com o preconizado pelo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCast (www.brcast.org.br).

Inicialmente foi realizada a suspensão de cada colônia em 3ml de salina 0,9%, em seguida, a turvação de cada tubo foi medida até a obtenção do valor de 0,5 na escala de MacFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml) com auxílio do aparelho Densichek Plus® (Biomérieux). Previamente foram

preparadas 525 placas de ágar Muller Hinton (Kasvi®), 346 placas de 150mm de diâmetro contendo 71 ml de ágar Muller Hinton (Kasvi®) em cada e, 173 placas de 90mm de diâmetro contendo 25 ml de ágar Muller Hinton (Kasvi®) em cada, conforme preconizado pelo BrCast.

A partir disso, cada suspensão formada foi inoculada em 2 placas de 150mm de diâmetro e em 1 placa de 90mm de diâmetro e, em seguida os discos de antimicrobianos da empresa BioRad® foram aplicados nas placas: Cefotaxima 5 µg; Cefepima 30 µg; Imipenem 10 µg Amoxicilina + Ácido Clavulânico 20/10 µg; Ampicilina + Sulbactam 10/10 µg; Meropenem 10 µg; Ertapenem 10 µg; Cefuroxima 30 µg; Piperacilina + tazobactam 30/6 µg; Cefoxitina 30 µg; Aztreonam 30 µg; Tigeciclina 15 µg; Amicacina 30 µg; Gentamicina 10 µg; Fosfomicina 200 µg; Nitrofurantoina 100 µg; Ceftazidima 10 µg; Levofloxacina 5 µg; Ciprofloxacina 5 µg; Ampicilina 10 µg; Tobramicina 10 µg; Sulfametoxazol +Trimetoprim 23,75/1,25 µg; Ceftriaxona 30 µg.

Os discos de antimicrobianos foram dispostos de forma a identificar não somente a resistência presente em cada disco, mas também outros possíveis mecanismo de resistência, como a produção de ESBL através do processo de sinergismo (“*Ghost- Zone*”) através da aproximação dos discos de Amoxicilina + Ácido Clavulânico 20/10µg e Cefalosporinas de terceira geração. Para isso, a distância entre os discos foi de 2 mm.

Todas as placas foram incubadas a 35 ± 1 °C durante 24h e posteriormente os halos de inibição para cada antimicrobiano foram analisados através da tabela de pontos de corte clínicos do BrCAST (BRCAST, 2020). As tabelas utilizadas foram para os microrganismos da ordem *Enterobacterales*, *Enterococcus spp.* e *Staphylococcus coagulase negativa*, conforme os resultados dos testes bioquímicos e coloração de Gram realizados para a identificação presuntiva das colônias.

Por fim, destaca-se que todas as amostras que apresentaram resultados discrepantes ou incoerentes com o esperado, tiveram o TSA repetido, para confirmação de tais resultados. E também, foi realizado o crescimento de determinadas amostras em meio BHI enriquecido com os antimicrobianos específicos para estímulo dos plasmídeos presentes com os genes de resistência específicos.

4.3.6 Teste Blue-Carba

O teste foi realizado para as colônias que apresentaram resistência aos carbapenêmicos no TSA, para verificar a produção de carbapenemase. O teste foi executado a partir da detecção rápida de carbapenemases direto de placas de cultivo através o kit Blue-Carba da empresa Diagnósticos Microbiológicos Especializados (DME), no qual foi utilizado uma solução teste, constituída de um frasco contendo Imipenem 3mg, com posterior adição de uma solução aquosa de azul de bromotimol a 0,04% e pH 7,0 no momento do teste.

Para cada cepa a ser testada foram utilizados 2 microtubos. No tubo I (controle) foram adicionados 200 µL da solução de Azul de Bromotimol, já no tubo II (teste), foram adicionados 200 µL da solução de Azul de Bromotimol + Imipenem. Em seguida, em cada tubo do tipo eppendorf, foi adicionada uma alçada de 10 µL de colônias crescidas em meio Mueller Hinton Ágar. Por fim, os tubos foram fechados e incubados a 35 °C durante 120 min com agitação constante. A leitura dos testes foi realizada a cada 15 min. O teste se baseia na hidrólise enzimática do anel β lactâmico de um carbapenêmico (geralmente imipenem) causando a acidificação de uma solução indicadora (Azul de bromotimol com pH 7,0) que muda de cor devido à modificação do pH (GARCÍA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2016). A mudança de cor para amarelo ou para verde significa positivo para a produção de carbapenemases. A interpretação dos resultados seguiu o descrito no Quadro 1.

Por fim, destaca-se que todas as amostras que apresentaram resultados discrepantes ou incoerentes com o esperado, tiveram o teste Blu-Carba repetido, para confirmação de tais resultados.

Quadro 1. Interpretação da detecção rápida de carbapenemases com o kit Blue-carba.

Cor: Tubo controle (Azul de bromotimol)	Cor: Tubo teste (Azul de bromotimol + Imipenem)	Interpretação
Azul	Amarelo	Carbapenemase Positivo
Azul	Verde- Amarelado	Carbapenemase Positivo
Verde	Amarelo	Carbapenemase Positivo
Azul	Azul	Carbapenemase Negativo
Verde	Verde	Carbapenemase Negativo
Amarelo	Azul, Verde ou Amarelo	Teste inválido

Fonte: autora.

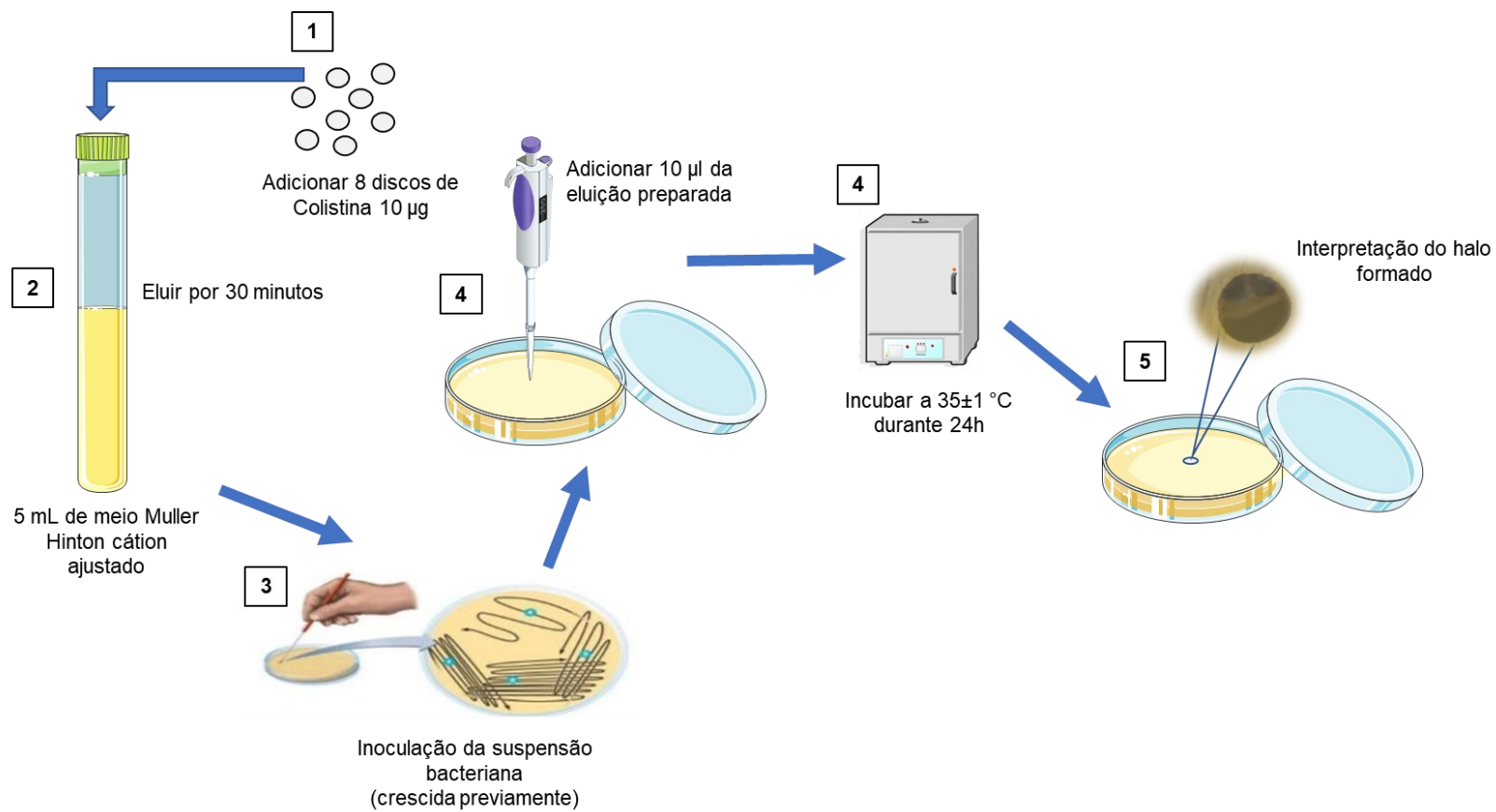
4.3.7 Teste de triagem – “Colistin Drop Test”

O teste de triagem utilizando a Colistina (Poliximina E) (BioRad®), conhecido como “*Colistin Drop Test*” foi realizado para todos os 173 isolados obtidos, com a finalidade de triar as amostras que apresentam maior sensibilidade aos antimicrobianos das amostras que apresentam um perfil de resistência às polimixinas, ou seja, esse teste permite identificar um heteroresistência da população bacteriana, a qual é definida como um fenômeno no qual uma população bacteriana, aparentemente homogênea, apresenta diferentes graus de sensibilidade a um determinado antimicrobiano, como é descrito por El-Halfawy e Valvano (2015). O presente teste foi realizado conforme orientado por Pasteran F e colaboradores durante o 28° ECCMID (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*), tendo como base o trabalho desenvolvido por Jouy e colaboradores (2017).

O teste foi realizado através da eluição de 8 discos de colistina 10 µl em 5 ml do meio Mueller Hinton cátion-ajustado (Sigma-Aldrich, EUA) durante 30 min, com a finalidade de obter uma solução com concentração final de 16 µl/ml. Concomitantemente, foram preparadas 173 placas de petri de 90x15 mm contendo o meio ágar Muller Hinton.

Em seguida, foi realizada a suspensão de cada colônia em 3 ml de salina 0,9%, e a turvação de cada tubo foi medida até a obtenção de 0,5 da escala de MacFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml) com auxílio do aparelho Densichek Plus® (Biomerieux), a partir disso, a suspensão foi inoculada na placa de meio Muller Hinton. Por fim, foram adicionados em forma de gota 10 µL da solução de colistina no centro da placa. Todas as placas foram incubadas a 35 ± 1 °C durante 24h e posteriormente foram analisados os halos formados. A metodologia utilizada está ilustrada na Figura 24.

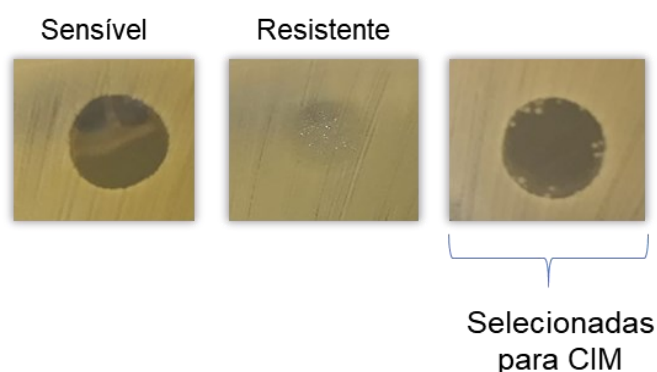
Figura 24. Fluxograma didático para o teste de triagem com colistina (“Colistin- Drop Test”).



Fonte:autora.

A interpretação dos halos foi realizada da seguinte forma: Presença de halo de inibição considerado sensível, se não apresentar halo de inibição considerar resistente. E por fim, as amostras que apresentaram colônias dentro do halo de inibição formado, conforme a Figura 25, foram selecionadas para a determinação da concentração inibitória mínima.

Figura 25. Halos de inibição formados no teste de triagem com colistina (“Colistin- Drop Test”).



Fonte:autora.

4.3.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para Polimixina B

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para Polimixina B, foi realizada para as amostras que apresentaram resistência e colônias dentro do halo de inibição formado no teste de triagem com a colistina e, para as 5 amostras positivas para *mcr-1*.

A metodologia adotada para a determinação da CIM foi a microdiluição em caldo segundo as normas estabelecidas pela CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2018). Os critérios de interpretação seguiram as recomendações do BrCAST para a polimixina B (BrCAST, 2020) (Quadro 2).

Quadro 2. Pontos de corte para MIC de Polimixina B, segundo BrCAST.

Antimicrobiano	Pontos de Corte		
	S	I	R
Polimixina B	2	-	>2

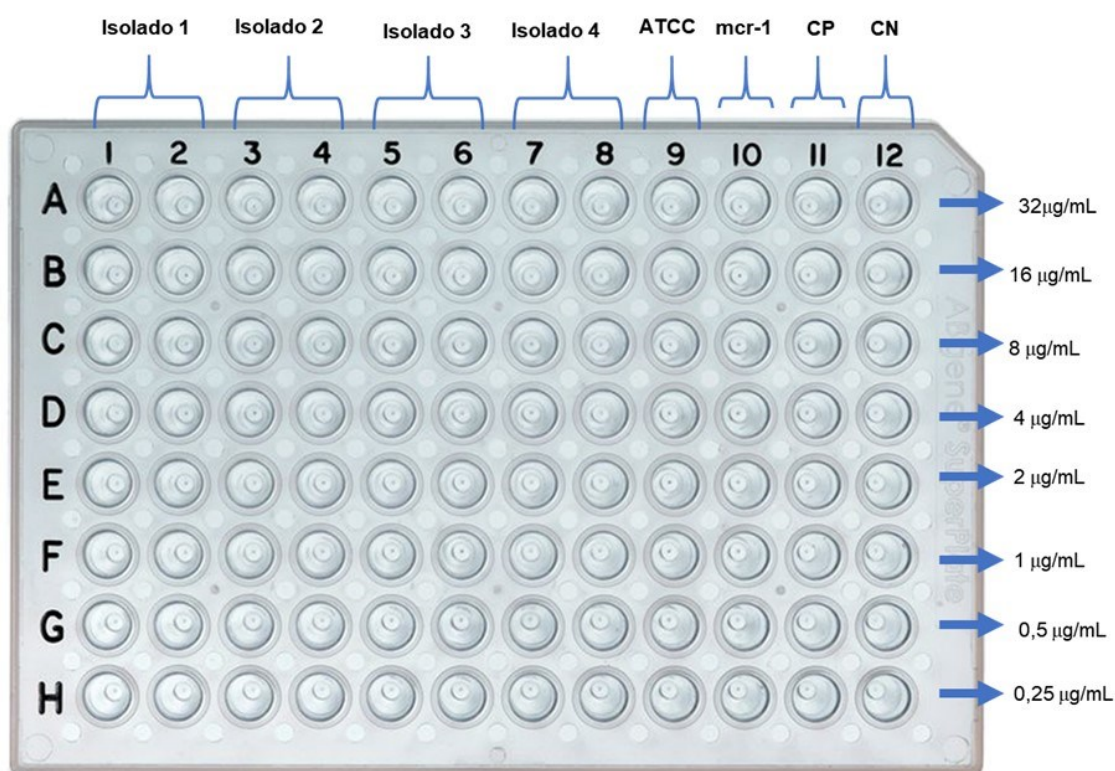
Fonte:autora.

Para a realização do procedimento, foram utilizadas placas de cultura estéreis de 96 poços com fundo em formato de “U”, para melhor visualização do

resultado. Inicialmente, foram adicionados 100 μL de caldo Mueller Hinton cátion-ajustado concentrado 2 vezes, com pH de $7,4 \pm 0,2$ (Sigma-Aldrich, EUA) em todos os poços da placa de cultura. Em seguida, o antimicrobiano diluído foi adicionado nos poços, com exceção do controle positivo de crescimento dos isolados. A concentração do antimicrobiano foi preparada de modo que a concentração final apresentasse concentrações superiores e inferiores ao ponto de corte estabelecido pelo BrCAST.

Em seguida, foi preparado o inóculo de cada isolado em salina estéril 0,9%, a partir de culturas frescas (máximo de 24 horas). O inóculo foi preparado para possuir turbidez de 0,5 na escala de McFarland, a qual foi aferida com o auxílio do aparelho Densichek™ Plus (Biomérieux). Essa suspensão foi diluída na proporção de 1:10 para ajuste da concentração para aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, então, foram adicionados 5 μL dessa diluição, em duplicata, à placa contendo o meio de cultura e o antimicrobiano. A concentração final de células foi de 5×10^4 UFC/poço e, para cada placa foram testados 4 isolados diferentes em duplicata, conforme a Figura 26.

Figura 26. Placa representativa de microdiluição em caldo para polimixina.



Fonte: autora.

Para o controle de qualidade do teste, foram adicionados ao ensaio uma cepa controle sensível às poliximinas (*E. coli* ATCC 25922) e um isolado resistente (*E. coli* com gene *mcr-1*).

Para a interpretação dos resultados, foram considerados resistentes às polimixinas quando isolados com CIM > 2 µg/mL. A análise dos resultados foi realizada de forma visual, na qual observou-se a turvação do poço da placa, indicando um crescimento bacteriano. Ressalta-se que na presença de crescimento bacteriano nas concentrações utilizadas, foram realizados novos testes com concentrações maiores de Polimixina B.

4.4 Técnicas não dependentes de cultura celular

4.4.1 Extração de DNA

Para a obtenção do DNA total das amostras, os isolados bacterianos foram semeados em ágar Muller Hinton, incubados a 37°C por 18 a 24h. Após esse período, em um microtubo de 1,5 ml contendo água ultra-pura estéril, preparou-se uma suspensão densa a partir da raspagem das colônias. A suspensão foi fervida em banho-maria a 100°C por 15 min, com o intuito de lisar as células bacterianas liberando o seu material genético. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 2 min a 5.600 x g. O sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para outro microtubo de 0,6 ml e armazenado a -20°C até o momento da reação de PCR. Conforme descrito por Dallenne e colaboradores (2010).

4.4.2 Iniciadores

Para realizar a reação de PCR, foram obtidos iniciadores correspondentes às sequências dos genes de resistência propostos para o estudo. As sequências utilizadas foram retiradas de estudos realizados anteriormente por Zamparetti (2014), Lescat (2018), Dallenne (2010) e Tartari (2015). A especificidade de todos os iniciadores utilizados foi avaliada pela ferramenta Primer Blast (NCBI). Ressalta-se que para a amplificação dos genes *blaKPC*, *blaNDM* e *blaCTX-M*, foram utilizados iniciadores para qPCR e, para os genes *mcr* foi utilizado apenas o tipo *mcr-1* como controle positivo para cada reação.

A lista completa dos iniciadores utilizados neste estudo está disposta no Quadro 3.

Quadro 3. Sequência de iniciadores utilizados para a identificação dos genes de resistência.

Gene		Iniciadores	Tamanho do produto	Referência
<i>bla</i> TEM	F	TTC CGT GTC GCC CTT ATT C	782 pb	Modificado de (DALLEENNE <i>et al.</i> , 2010)
	R	CCT GAC TCC CCG TCG TGT A		
<i>bla</i> SHV	F	GCA AAT TAA ACT AAG CGA AAG CC	705 pb	Modificado de (DALLEENNE <i>et al.</i> , 2010)
	R	GTA TCC CGC AGA TAA ATC ACC AC		
<i>mcr-1</i>	F	ATG CCA GTT TCT TTC GCG TG	502 pb	(LESCAT; POIREL; NORDMANN, 2018)
	R	TCG GCA AAT TGC GCT TTT GGC		
<i>mcr-2</i>	F	GAT GGC GGT CTA TCC TGT AT	379 pb	(LESCAT; POIREL; NORDMANN, 2018)
	R	AAG GCT GAC ACC CCA TGT CAT		
<i>mcr-3</i>	F	ACC AGT AAA TCT GGT GGC GT	296 pb	(LESCAT; POIREL; NORDMANN, 2018)
	R	AGG ACA ACC TCG TCA TAG CA		
<i>mcr-4</i>	F	TTG CAG ACG CCC ATG GAA TA	207 pb	(LESCAT; POIREL; NORDMANN, 2018)
	R	GCC GCA TGA GCT AGT ATC GT		
<i>mcr-5</i>	F	GGA CGC GAC TCC CTA ACT TC	608 pb	(LESCAT; POIREL; NORDMANN, 2018)
	R	ACA ACC AGT ACG AGA GCA CG		
<i>bla</i> CTX-M 1	F	GCA AAC TCT GCG GAA TCT GAC G	182 pb	Tartari, Daniela C ZAMPARETTE, Caetana P
	R	CCG CGA TAT CGT TGG TGG TG		
<i>bla</i> CTX-M 2	F	GAT GGC GAC GCT ACC CCT GC	204 pb	Tartari, Daniela C ZAMPARETTE, Caetana P
	R	GCG GCC GCC ATC ACC TTA CT		
<i>bla</i> CTX-M 9	F	AAT CCG ATT GCC GAA AAA CAC G	135 pb	Tartari, Daniela C ZAMPARETTE, Caetana P
	R	AGC CGT CAC GCC TCC CG		
<i>bla</i> KPC	F	GCC GCT GGC TGG CTT TTC TG	120 pb	Tartari, Daniela C ZAMPARETTE, Caetana P
	R	GCG CCT GAG CCG GTA TCC AT		
<i>bla</i> NDM	F	GGT TTC GGG GCA GTC GCT TC	184 pb	Tartari, Daniela C ZAMPARETTE, Caetana P
	R	CCA TAC CGC CCA TCT TGT CCT G		

Fonte: autora.

Os iniciadores TEM amplificam os tipos: TEM 1, TEM 19, TEM 52, TEM 116, TEM 135, TEM 143, TEM 153, TEM 177, TEM 183, TEM 185, TEM 186, TEM 188, TEM 189, TEM 190, TEM 193, TEM 194, TEM 195, TEM 196, TEM 197, TEM 199, TEM 201 (DALLEENNE *et al.*, 2010).

Os iniciadores SHV amplificam os tipos: SHV 1, SHV 2, SHV 5, SHV 7, SHV 8, SHV 10, SHV 11, SHV 12, SHV 13, SHV 18, SHV 19, SHV 24, SHV 25, SHV 26, SHV 27, SHV 28, SHV 29, SHV 30 - 38, SHV 40-44, SHV 46, SHV 48, SHV 49 SHV 50, SHV 51, SHV 55, SHV 56, SHV 57, SHV 59, SHV 60 – 71, SHV 73, SHV 83, SHV 85, SHV 86, SHV 89, SHV 92, SHV 93 – 107, SHV 108, SHV 109, SHV 120-126, SHV 129, SHV 132, SHV 133, SHV 134, SHV 135, SHV 136, SHV 137 SHV 140, SHV 141, SHV 142, SHV 144, SHV 145, SHV 147, SHV 148, SHV 150 - 163, SHV 165, SHV 167, SHV-168 (DALLEENNE *et al.*, 2010).

Os iniciadores para os genes *mcr*, amplificam especificamente para os tipo: *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* e *mcr-5* (LESCAT; POIREL; NORDMANN, 2018)

Os iniciadores CTX-M do grupo 1 amplificam para os tipos: CTX-M 1, CTX-M 3, CTX-M 12, CTX-M 15, CTX-M 22, CTX-M 23, CTX-M 28, CTX-M 29, CTX-M 33, CTX-M 42, CTX-M 52, CTX-M 54, CTX-M 55, CTX-M 60, CTX-M 62, CTX-M 66, CTX-M 69, CTX-M 72, CTM-X 79, CTX-M 80, CTX-M 82, CTX-M 96, CTX-M 101, CTX-M 103, CTX-M 114, CTX-M 116, CTX-M 117, CTX-M 132, CTX-M 136, CTX-M 139, CTX-M 142, CTX-M 144, CTX-M 150, CTX-M 155, CTX-M 156, CTX-M 157, CTX-M 162, CTX-M 163, CTX-M 164, CTX-M 167, CTX-M 170, CTX-M 172, CTX-M 173, CTX-M 176, CTX-M 179, CTX-M 180, CTX-M 181, CTX-M 182, CTX-M 183 e CTX-M 184.

Os iniciadores CTX-M do grupo 2 amplificam para os tipos: CTX-M 2, CTX-M 4, CTX-M 5, CTX-M 6, CTX-M 7, CTX-M 20, CTX-M 31, CTX-M 35, CTX-M 43, CTX-M 44, CTX-M 56, CTX-M 59, CTX-M 76, CTX-M 77, CTX-M 92, CTX-M 95, CTX-M 97, CTX-M 115, CTX-M 124, CTX-M 131, CTX-M 141, CTX-M 165, CTX-M 171.

Os iniciadores CTX-M do grupo 9 amplificam para os tipos: CTX-M 9, CTX-M 13, CTX-M 14, CTX-M 16, CTX-M 17, CTX-M 19, CTX-M 21, CTX-M 24, CTX-M 27, CTX-M 38, CTX-M 46, CTX-M 47, CTX-M 48, CTX-M 49, CTX-M 50, CTX-M 51, CTX-M 65, CTX-M 73, CTX-M 81, CTX-M 83, CTX-M 84, CTX-M 85, CTX-M 87, CTX-M 90, CTX-M 93, CTX-M 98, CTX-M 99, CTX-M 102, CTX-M 104, CTX-M 105, CTX-M 112, CTX-M 113, CTX-M 122, CTX-M 125, CTX-M 126, CTX-M 129, CTX-M 130, CTX-M 132, CTX-M 134, CTX-M 137, CTX-M 147, CTX-M 148, CTX-M 159, CTX-M 168 e CTX-M 174.

Os iniciadores KPC amplificam os tipos: KPC-1, KPC-2, KPC- 3, KPC- 4, KPC- 5, KPC- 6, KPC- 7, KPC- 8, KPC- 10, KPC- 11, KPC-12, KPC-13, KPC-14, KPC- 15, KPC-16, KPC- 17, KPC- 18, KPC- 19, KPC- 21, KPC- 22, KPC- 24 e KPC-25.

E finalmente, os iniciadores NDM amplificam os tipos: NDM-1, NDM- 2, NDM- 3, NDM- 4, NDM- 5, NDM- 6, NDM- 7, NDM- 8, NDM- 9, NDM- 10, NDM-11, NDM- 12, NDM- 13, NDM- 14, NDM- 15 e NDM- 16.

4.4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Inicialmente, foram realizados testes para determinação das concentrações ideais de cada reagente presente na reação. A partir dessa padronização, foram realizadas 3 reações de PCR multiplex para os genes *bla*TEM e *bla*SHV; *mcr* grupo 1, 2, 3, 4 e 5; *bla*CTX-M grupo 1, 2 e 9. E, previamente, todas amostras de DNA foram diluídas, para a obtenção de uma concentração de 50ng de DNA. As reações realizadas são descritas no Quadro 4.

Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (genes TEM e SHV) e 2% (genes *mcr*, *bla*CTX-M, *bla*NDM e *bla*KPC) em tampão TBE (Tris 89 mM, Borato 89 mM, 2 mM EDTA). O gel foi corado com brometo de etídio 10 mg/ml (1 µl), o qual foi incorporado ao gel, e fotografado exposto à luz UV em um transiluminador. O padrão de tamanho molecular utilizado foi de 1 Kb (Promega®), como padrão de referência para os genes *bla*TEM, *bla*SHV e *mcr* e de 100 pb (Ludwig®) como padrão de referência para os genes *bla*CTX-M, *bla*NDM e *bla*KPC. A Figura 27 ilustra a interpretação realizada para cada produto amplificado a partir de cada iniciador utilizado.

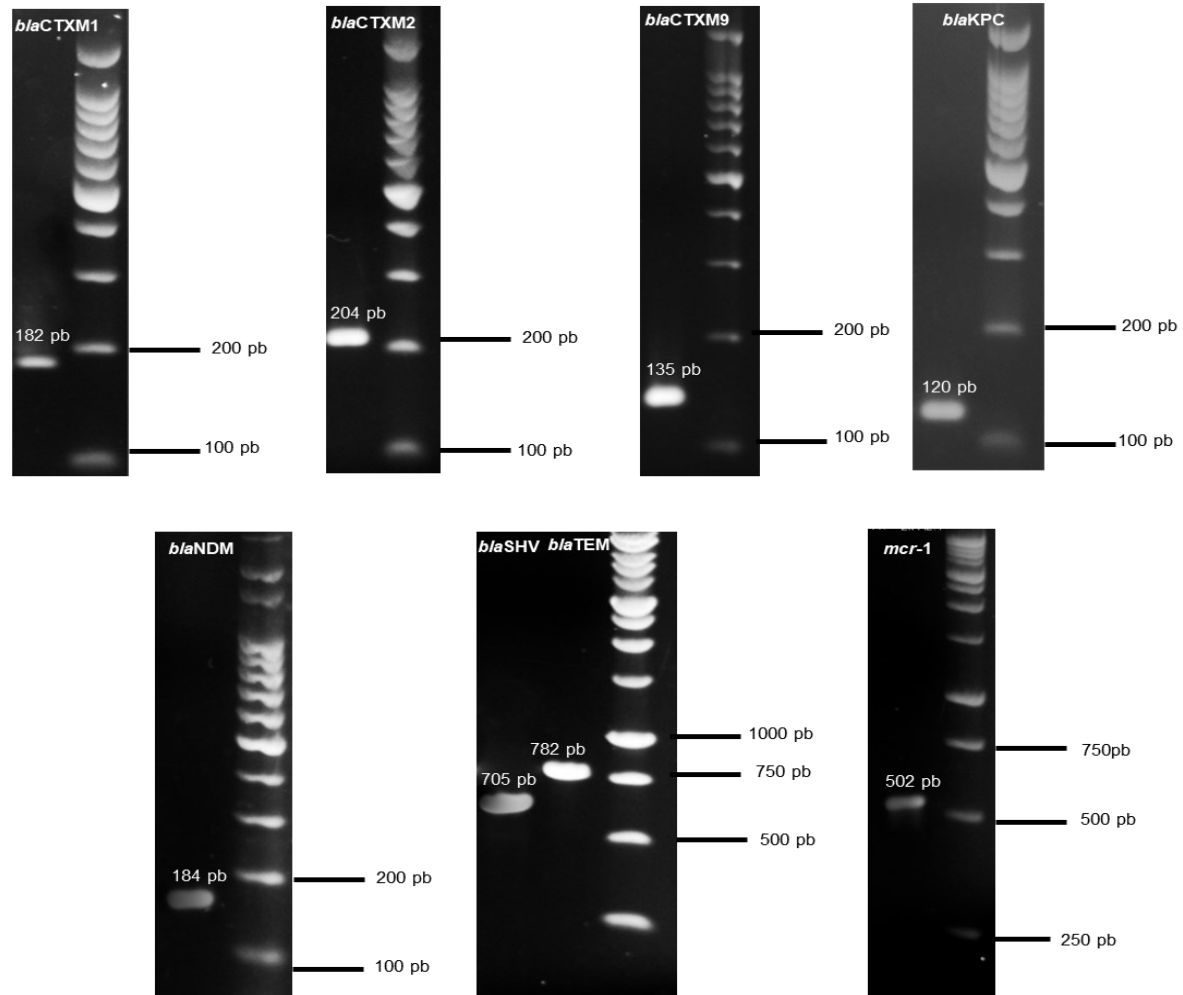
Quadro 4. Condições para as reações de PCR.

Genes	Kit utilizado	Volume Final	Tampão Enzima	MgCl ₂	dntp	Primer F	Primer R	DNA polimerase	DNA	Água	Desnaturação	Amplificação	Extensão
<i>bla</i> TEM + <i>bla</i> SHV	Kit Promega®	10 µl	2 µl	0,6 µl (1,5mM)	1 µl (200mM)	2X 0,5 µl (1µM)	2X 0,5 µl (1µM)	0,2 µl (1U)	1 µl (50ng)	3,2 µl	95°C - 5min	[95°C - 30s / 56°C -40s / 72 -1min] x35	72°C - 7 min
<i>mcr</i> 1-5	Mastermix Promega®	25 µl	12,5 µl (Mix)	-	-	5x 1,1 µl (1µM)	5x 1,1 µl (1µM)	-	1 µl (50ng)	0,5 µl	94°C - 15 min	[94°C - 30 s / 58°C - 1 min 30 s / 72°C - 1 min] x25	72°C - 1 min
<i>bla</i> CTXM 1, 2 e 9	Kit Promega®	10 µl	2 µl	0,6 µl (1,5mM)	1 µl (200µM)	0,5 v (1µM)	0,5 uL (1µM)	0,2 µl (1U)	1 µl (50ng)	4,2 µl	95°C - 5 min	[95°C - 30 s / 63°C - 30 s / 72°C - 30 s] x35	72°C - 7 min
<i>bla</i> KPC	Mastermix Promega®	10 µl	5 µl (Mix)	-	-	1 µl (1µM)	1 uL(1µM)	-	1 µl (50ng)	2 µl	95°C - 5 min	[95°C - 30 s / 63°C - 30 s / 72°C - 30 s] x35	72°C - 7 min

<i>bla</i> NDM	Mastermix Promega®	10 µl	5 µl (Mix)	-	-	1 µl (1µM)	1 µl (1µM)	-	1 µl (50ng)	2 µl	95°C - 5 min	[95°C - 30 s / 63°C - 30 s / 72°C - 30 s] x35	72°C - 7 min
----------------	-----------------------	-------	---------------	---	---	---------------	---------------	---	----------------	------	--------------	--	-----------------

Obs.: O Tampão Mastermix Promega® já contém a DNA polimerase.
Fonte: autora.

Figura 27. Foto dos produtos amplificados de cada iniciador.



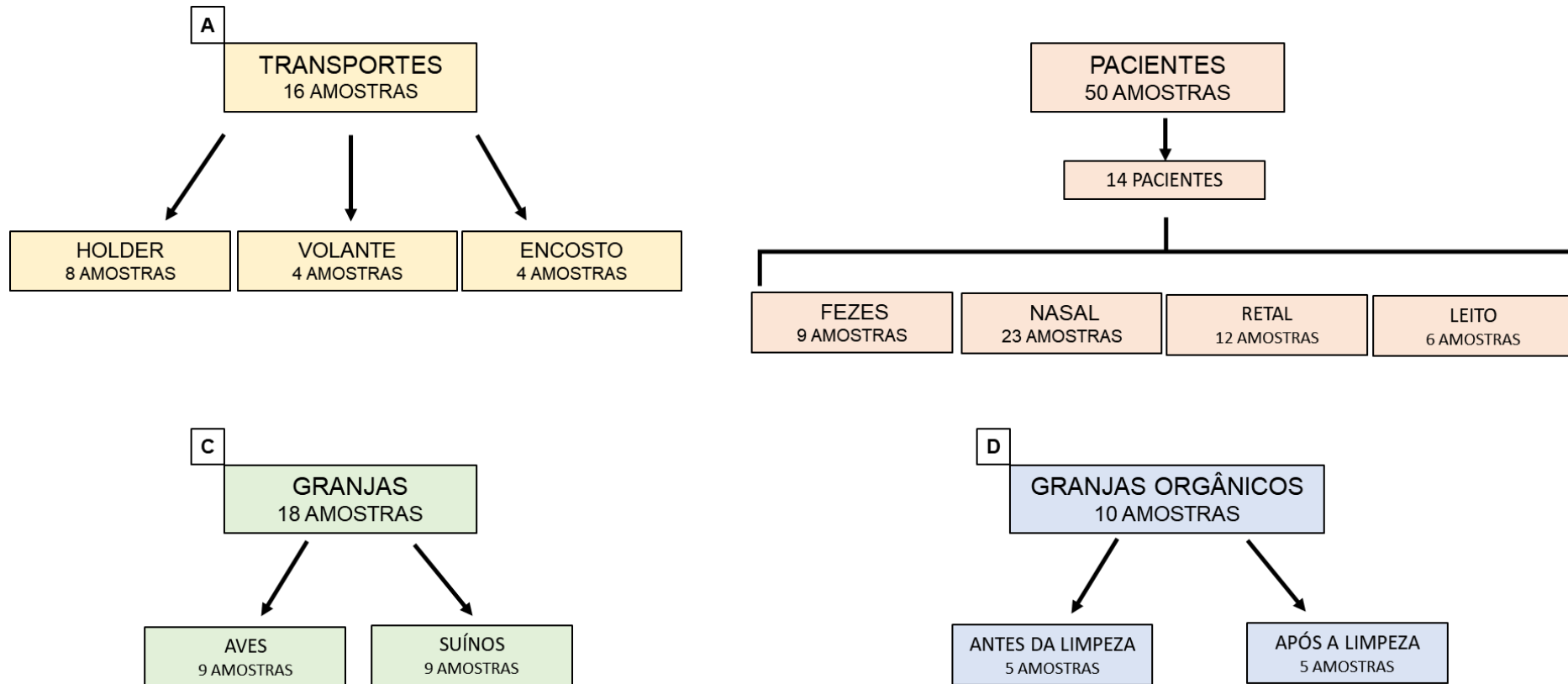
Fonte: autora.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Descrição das amostras coletadas

O total de amostras obtidas foram: 4 amostras de transportes, 14 amostras de pacientes, 9 amostras de granjas de aves, 9 amostras de granjas de suínos e 5 amostras de granjas de suínos orgânicos. Todas as amostras foram obtidas visando o uso de técnicas não dependentes de cultura celular e outra para técnicas microbiológicas, totalizando 8 amostras por veículo, devido a necessidade de coleta de 3 locais distintos dentro dos transportes, 50 amostras de pacientes, 18 amostras de granjas e 10 amostras de granjas de suínos orgânicos, devido a presença de dois momentos de coleta (1- Antes da limpeza do local. 2- Após a limpeza do local)(Figura 28).

Figura 28. Fluxogramas resumidos das amostras obtidas.



A) Amostras transportes; B) Amostras pacientes; C) Amostras granjas; D) Amostras granjas de suínos orgânicos.

Fonte: autora.

5.1.1 Amostras de Pacientes

Para maior compreensão das características clínicas de cada paciente, foram obtidos os dados de prontuários de cada um, os quais são ilustrados no Quadro 5. Esse quadro é composto pelos dados clínicos dos pacientes, juntamente com a sua farmacoterapia vigente durante o período de internação, o qual teve em média 16 dias, sendo a internação de menor permanência de 2 dias e, a mais longa de 43 dias. Destaca-se que 4 pacientes não fizeram uso de antimicrobianos durante o seu tratamento.

Quadro 5. Farmacoterapia vigente durante o período de internação para cada paciente.

Paciente	Cidade de Origem	Sexo	Idade (anos)	Tempo de internação	Motivo da internação	Unidade da internação	Unidade 2	Unidade 3	Unidade 4	Culturas positivas durante a internação (vigilância e infecções)	Uso de antimicrobianos durante a internação
1	Caibi	F	44	32 dias	Pênfigo com infecção cutânea	E. REP	CM I	-	-	E. coli ESBL + (Urina), Enterobacter Cloacae (Secreção de ferida cutânea)	Oxicilina (3 dias), Ciprofloxacina (7 dias), Metronidazol (1 dia), Aciclovir (5 dias), Albendazol (4 dias)
2	Videira	M	28	43 dias	Esclerose sistêmica e infecção por Mycobacterium (não tuberculosa)	E. REP	CM I	-	-	Micobactéria não-tuberculosa, Clostridium difficile (GDH+, Toxina A e B-)	Piperacilina + tazobactam (1 dia), RIPE (Tratamento para Mycobacterium não tuberculosa, 35 dias), Azitromicina (35 dias), Metronidazol (9 dias), Amicacina (35 dias), Meropenem (7 dias)
3	São Miguel do Oeste	M	31	8 dias	Acidente automobilístico	E. REP	UIC II	-	-	-	Cefazolina (profilaxia), 1 g de 8/8 h
4	Erval Velho	M	85	10 dias	Infecção cutânea em membro superior esquerdo	E. REP	UIC II	CM I	UIC II	Staphylococcus aureus MRSA (Drenagem de músculo)	Oxacilina (2 dias), Sulfametoxazol + trimetoprim (7 dias)
5	Concórdia	F	40	15 dias	Correção de eventração diafragmática recidivada	UIC I	UTI	UIC I	-	-	Não fez uso de antimicrobiano
6	Fraiburgo	M	50	2 dias	Hiperplasia Prostática Benigna	UIC II	-	-	-	-	Não fez uso de antimicrobiano
7	Caibi	M	60	7 dias	Lesão por pressão infectada em região sacral	E. REP	-	-	-	-	Clindamicina (6 dias), Ceftriaxona (6 dias)
8	Concórdia	F	49	6 dias	Hepatectomia e colecistectomia	UIC I	UTI	UIC I	-	-	Cefazolina (1 dia)
9	Irani	M	68	20 dias	Ciclo de quimioterapia. Neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas.	CM II	CM I	UTI (Óbito)	-	Secreção Traqueal 10/11 - Cocos gram+ isolados e aos pares, Enterococcus faecium (Cresc. abundante) e Candida spp. (cresc. escasso). Pseudomonas aeruginosa resistete ao Cefepime e Meropenem (Swab anal de vigilância 08/11)	Bactrim (1 dia), Sulfametoxazol + Trimetoprim (20 dias), Aciclovir (19 dias), Entecavir (15 dias), Cefepime (9 dias), Meropenem (5 dias), Polimixina (4 dias), Voriconazol (4 dias), Vancomicina (1 dia)
10	Passos Maia	M	46	14 dias	Abscesso hepático, coledocolitíase e colangite	E. REP	UIC II	-	-	-	Ampicilina + Sulbactam (4 dias)
11	São Miguel do Oeste	F	66	8 dias	Neoplasia maligna no lobo superior esquerdo	UIC I	UTI	UIC I	-	-	Cefazolina (2 dias)
12	São Carlos	M	59	4 dias	Hiperplasia Prostática Benigna	UIC I	-	-	-	-	Cetoconazol 1 dia
13	Concórdia	M	39	30 dias	Ciclo de quimioterapia. Recidiva de LMA.	CM II	CM I	CM II	-	-	Amoxicilina + clavulanato de potássio 875 mg 7 dia, Sulfametoxazol + trimetoprim 2 CP 3x/sem 30 dia, Cefepime 2 g 8/8h 19 dia, Meropenem 2 g 8/8h 13 dias, Voriconazol 200 mg 12/12h 7 dias, Linezolida 600 mg 12/12h 7 dias, Aciclovir 400 mg 12/12h 10 dias
14	Fraiburgo	M	29	32 dias	Investigação de dermatomiosite/poli miosite	E. REP	CM II	-	-	-	Não fez uso de antimicrobiano

Legenda: Em destaque os pacientes que não fizeram uso de antimicrobianos. F: Feminino; M:Masculino. E.REP: Unidade de recuperação. UIC: Unidade Clínica. CM: Clínica Médica UTI: Unidade Intensiva de Tratamento. Fonte: autora.

5.1.2 Amostras de Granjas de Aves e Suínos

Para facilitar o entendimento e nomeação das amostras, as mesmas foram caracterizadas pelo tipo de granja coletada (aves ou suínos), macroregião de coleta, pré-estabelecida pelos coletadores (regiões I, II, III) e número da amostra correspondente (1, 2 e 3).

As amostras provenientes das granjas foram coletadas em localidades de criação de suínos e aves de diferentes cidades da região Oeste do estado de Santa Catarina. Em relação aos aviários participantes da pesquisa, os mesmos trabalhavam somente com aves de corte fazendo uso ou não de antimicrobianos. Já as granjas de suínos trabalhavam com unidades de produção distintas, podendo ser de Unidades de Produção de Leitões (UPL), Unidades de Produção de Desmamados (UPD), Unidades de Terminação (UT) ou de Ciclo Completo (CC), esta última fazendo uso ou não de antimicrobianos, essas amostras são descritas no Quadro 6.

Para o presente estudo, foram realizadas coletas dos dejetos presentes nos locais de morada dos suínos e, já nas granjas de aves foram obtidas amostras de camas de palha utilizadas pelas aves. Totalizando 9 amostras de granjas de aves e 9 amostras de granjas de suínos, portanto, 18 amostras obtidas no estudo.

Quadro 6. Descrição das amostras coletas de granjas de suínos e aves.

	Código da amostra	Data Coleta	Tipo de material de Coleta	Cidade da Coleta	Tipo de Granja	Tipo de animal	Número médio de animais	Água da propriedade	Sistema de tratamento de dejetos	Antimicrobianos Mais Utilizados
AMOSTRAS DE GRANJAS DE AVES	GAI1	out/19	Cama de aviário	Jaborá	Aves de corte	-	16000	Fonte superficial	Fermentação em lona	<p>Tratamento = cefalexina.</p> <p>Aumento de conversão alimentar = lincomicina</p> <p>Outros: sulfacorpidazida sódica; trimetopina; macrolídeos; lincosamidas tylosina; lincomicina; beta-lactâmicos (penicilina, amoxicilina, ceftiofur); aminoglicosídeos (gentamicina, neomicina); fluoroquinonas (enrofloxacin, danofloxacin); tetraciclina (tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina); estreptograminas (virginiamicina); polipeptídeos (bacitracina); fenicóis (florfenicol); pleuromutilina.</p>
	GAI2	out/19	Cama de aviário	Jaborá	Aves de corte	-	12000	Fonte superficial com cloração em pastilha	Fermentação em lona	
	GAI3	out/19	Cama de aviário	Concórdia	Aves de corte	-	12000	Fonte superficial com cloração em pastilha	Fermentação em lona	
	GAI11	out/19	Cama de aviário	Xanxerê	Aves de corte	-	11000	Fonte superficial com cloração em pastilha	Fermentação em lona	
	GAI12	out/19	Cama de aviário	Xanxerê	Aves de corte	-	15000	Fonte superficial com cloração em pastilha	Fermentação em lona	
	GAI13	out/19	Cama de aviário	Chapecó	Aves de corte	-	15000	Fonte superficial com cloração em pastilha	Fermentação em lona	
	GAI111	out/19	Cama de aviário	Joaçaba	Aves de corte	-	10000	Fonte superficial com cloração em pastilha	Fermentação em lona	
	GAI112	out/19	Cama de aviário	Capinzal	Aves de corte	-	14000	Fonte superficial com cloração em pastilha	Fermentação em lona	
	GAI113	out/19	Cama de aviário	Capinzal	Aves de corte sem antibiótico	-	60	Fonte superficial, sem cloração	Compostagem	
AMOSTRAS DE GRANJAS DE SUÍNOS	GSI1	out/19	Dejeto de suíno	Concórdia	UPL - leitões	Suínos leitões (crechário)	800	Poço artesiano	Esterqueira - fermentação	<p>Tratamento = penicilinas; cefalosporina; tetraciclina; macrolídeos; lincosamidas; pleuromutilinas; sulfonamidas (sulfametoxazol-trimetoprim); quinolonas; rifampicina.</p>
	GSI2	out/19	Dejeto de suíno	Concórdia	UPDs - desmamados	Suínos desmamados	850	Poço artesiano	Biodigestor	
	GSI3	out/19	Dejeto de suíno	Xavantina	UPDs - desmamados	Suínos desmamados	600	Poço artesiano	Biodigestor	
	GSI11	out/19	Dejeto de suíno	Seara	UPL - leitões	Suínos leitões (crechário)	650	Poço artesiano	Biodigestor	
	GSI12	out/19	Dejeto de suíno	Seara	UPDs - desmamados	Suínos desmamados	650	Poço artesiano	Esterqueira - fermentação	
	GSI13	out/19	Dejeto de suíno	São Miguel do Oeste	UT - Unidade de terminação	Suínos engorda	600	Poço artesiano	Biodigestor	
	GSI111	out/19	Dejeto de suíno	Joaçaba	UT - Unidade de terminação	Suínos engorda	600	Poço artesiano	Biodigestor	
	GSI112	out/19	Dejeto de suíno	Videira	Ciclo completo (CC)	Suínos totais	10000	Poço artesiano	Biodigestor	
	GSI113	out/19	Dejeto de suíno	Capinzal	Ciclo completo (CC) sem antibiótico	Suínos totais	25	Fonte superficial, sem cloração	Esterqueira - fermentação	

Legenda: GS: Granjas de Suínos. GA: Granjas de Aves. UPD: UPDs: Unidades Produtoras de Desmamados. UPL: Unidades Produtoras de Leitões.
Fonte: autora.

5.1.3 Amostras de Granjas de Suínos orgânicos

As amostras de granjas de suínos orgânicos foram obtidas em 2 momentos de coleta. O primeiro momento, foi anteriormente a limpeza do local de morada dos suínos. O segundo momento, foi após a limpeza do local, totalizando 10 amostras de dejetos orgânicos de suínos. As granjas em estudo trabalhavam com unidades de produção distintas, podendo ser de Unidades de Produção de Leitões (UPL) e Unidades de Produção de Desmamados (UPD). As amostras obtidas são descritas no Quadro 7.

Quadro 7. Descrição das amostras coletas de granjas de suínos orgânicos.

Código da amostra	Tipo de material de Coleta	Cidade da Coleta	Tipo de Granja	Animal	Número médio de animais	Água da propriedade	Sistema de tratamento de dejetos	Disposição do dejetos
SGO1.1	Antes de tratamento	Concórdia	UPDs - desmamados	Suínos desmamados	650	Fonte superficial, cloração	Biodigestão anaeróbia	Biofertilizante
SGO1.2	Depois do tratamento	Concórdia	UPDs - desmamados	Suínos desmamados	650	Fonte superficial, cloração	Biodigestão anaeróbia	Biofertilizante
SGO2.1	Antes de tratamento	Concórdia	UPDs - desmamados	Suínos desmamados	650	Poço artesiano	Biodigestão anaeróbia	Biofertilizante
SGO2.2	Depois do tratamento	Concórdia	UPDs - desmamados	Suínos desmamados	650	Poço artesiano	Biodigestão anaeróbia	Biofertilizante
SGO3.1	Antes de tratamento	Concórdia	UPDs - desmamados	Suínos desmamados	650	Poço artesiano	Biodigestão anaeróbia	Biofertilizante
SGO3.2	Depois do tratamento	Concórdia	UPDs - desmamados	Suínos desmamados	650	Poço artesiano	Biodigestão anaeróbia	Biofertilizante
SGO4.1	Antes de tratamento	Concórdia	UPL - leitões	Suínos leitões (crechário)	650	Poço artesiano	Biodigestão anaeróbia	Biofertilizante
SGO4.2	Depois do tratamento	Concórdia	UPL - leitões	Suínos leitões (crechário)	650	Poço artesiano	Biodigestão anaeróbia	Biofertilizante
SGO5.1	Antes de tratamento	Concórdia	UPL - leitões	Suínos leitões (crechário)	650	Poço artesiano	Biodigestão anaeróbia	Biofertilizante
SGO5.2	Depois do tratamento	Concórdia	UPL - leitões	Suínos leitões (crechário)	650	Poço artesiano	Biodigestão anaeróbia	Biofertilizante

Legenda: SGO: Granjas de Suínos Orgânicos. UPD: UPDs: Unidades Produtoras de Desmamados. UPL: Unidades Produtoras de Leitões.
Fonte: autora.

5.2 Isolados obtidos

A partir da abordagem *One Health*, acredita-se que não se compreende a saúde humana, animal e ambiental, abordando cada uma delas de forma isolada. Para enfrentar os desafios complexos da saúde pública, deve-se entender a interconexão entre esses ambientes distintos. Portanto, o paradigma da Saúde Única tem como origem, o reconhecimento de que as doenças, muitas vezes, surgem das interações entre humanos e animais, influenciadas inicialmente por um medicamento, o qual é incorporado na saúde preventiva do homem e seus animais. Portanto, a avaliação combinada dos riscos para a saúde nos três domínios: humanos, animais e meio ambiente, envolve a implementação de intervenções estratégicas que abordem todos os três setores, com o objetivo de produzir um conhecimento entre todos os ambientes e, assim, compreender a dinâmica de circulação das mais diversas doenças (*DALTON et al., 2020*).

Sendo assim, no presente trabalho analisou-se amostras que abordam esses 3 ambientes descritos anteriormente; homem, animal e meio ambiente, com a finalidade de compreender a dinâmica de disseminação de diferentes genes de resistência bacteriana.

Inicialmente, as amostras foram submetidas a uma seleção microbiológica, através da utilização de antimicrobianos específicos (Ceftriaxona 2 ug/mL; Meropenem 2 ug/mL, Polimixina B 2 ug/mL, Vancomicina 2 ug/mL e Cefoxitina 2 ug/mL), e assim, obtendo diversos isolados bacterianos conforme o antimicrobiano utilizado para a seleção, conforme o Quadro 8.

Quadro 8. Quantificação total de isolados bacterianos conforme antimicrobiano utilizado na seleção.

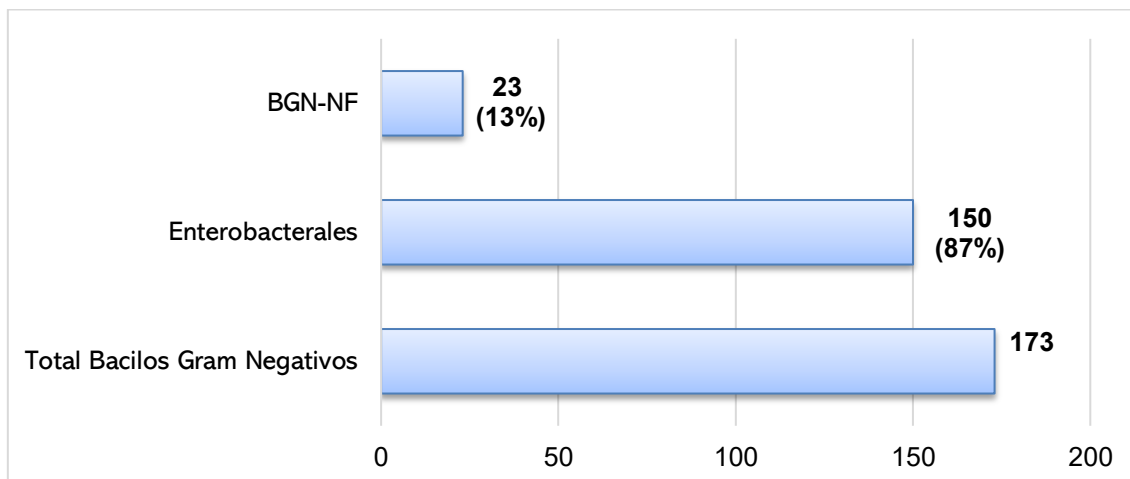
	Ceftriaxona (2 ug/mL)	Meropenem (2 ug/mL)	Polimixina B (2 ug/mL)	Vancomicina (2 ug/mL)	Cefoxitina (2 ug/mL)
Granjas Suínos	8	4	7	26	3
Granjas Aves	6	4	1	16	8
Pacientes	33	18	26	-	-
Transportes	1	3	4	3	-
Granjas Orgânicos	Antes da Limpeza				
	8	6	5	8	7
	Após a Limpeza				
	10	10	13	12	6
TOTAL:	66	45	56	65	24
	256				

Fonte: autora.

Portanto, foi obtido um total de 256 isolados bacterianos correspondentes às amostras de granjas, pacientes e transportes. Desses, 173 (67,5%) isolados foram bacilos Gram-negativos, os quais foram utilizados no presente trabalho.

A partir do Gram realizado, as amostras foram submetidas a diversos testes bioquímicos, para maior certeza da identificação do isolado. Iniciou-se então, a inoculação de cada isolado em tubos contendo OF de glicose, o qual possibilitou a separação dos isolados em dois grandes grupos; as colônias Gram-negativas não fermentadoras de glicose e as fermentadoras de glicose. Ressalta-se que uma colônia foi caracterizada como assacarolítica no teste OF de glicose e, com isso não sendo analisada no presente trabalho. Observou-se que dos 173 isolados de bacilos Gram-negativos totais, 23 (13%) deles foram caracterizados como bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose (BGN-NF) e, os 150 (87%) foram caracterizados como da ordem *Enterobacterales* (Figura 29). As colônias foram submetidas a novos testes bioquímicos (Crescimento em BHI -42°C; Crescimento em MacConkey; Oxidase; Motilidade -BHI 42°C; Cetrimide; OF xilose; OF maltose e OF lactose), para uma identificação mais precisa das colônias. Após os testes, todos os isolados foram submetidos ao Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA).

Figura 29. Isolados de bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose.



Legenda: BGN-NF: Bacilo Gram negativo não fermentador de glicose.

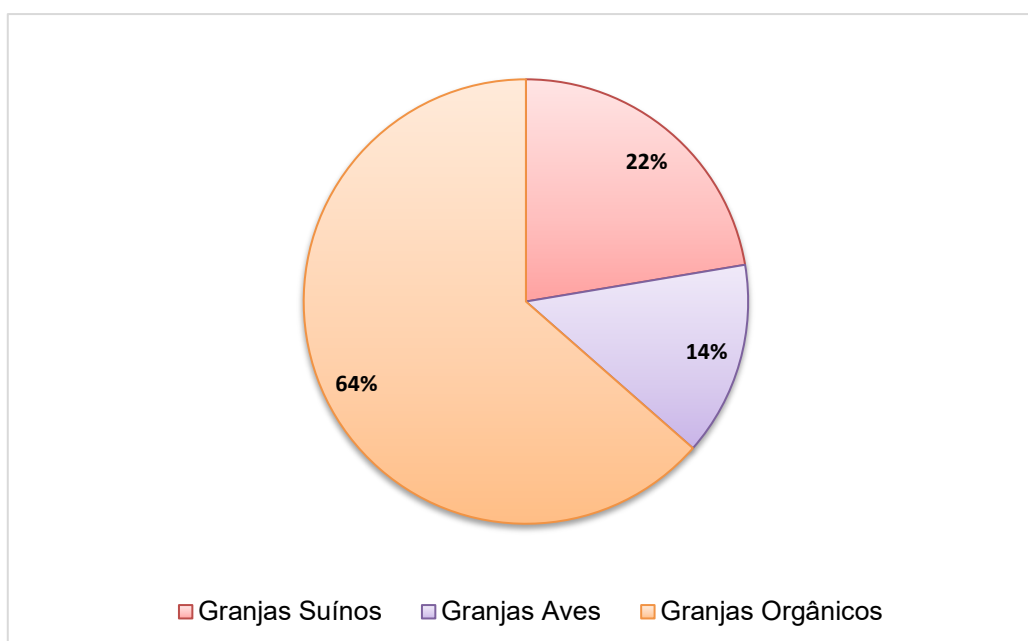
Fonte: autora.

Do total de 173 isolados utilizados no estudo, 85 (49%) são isolados bacterianos totais das amostras de granjas, dos quais 19 (22%) isolados são de amostras de granjas de suínos, 12 (14%) isolados são de amostras de granjas de aves e 54 (63,5%) isolados são de amostras de granjas de suínos orgânicos, os quais foram obtidos de amostras coletadas em dois períodos de coleta (antes da limpeza e após a limpeza das granjas), conforme a Tabela 1 e Figura 30.

Tabela 1. Descrição do isolados bacterianos obtidos nas amostras de granjas.

Amostras Granjas	Período de coleta			N° isolados
	Antes da limpeza	Após a limpeza	Único	
Granjas Suínos	-	-	19	19
Granjas Aves	-	-	12	12
Granjas suínos orgânicos	21	33	-	54
TOTAL				85

Fonte: autora.

Figura 30. Isolados bacterianos obtidos nas amostras de granjas.

Fonte: autora.

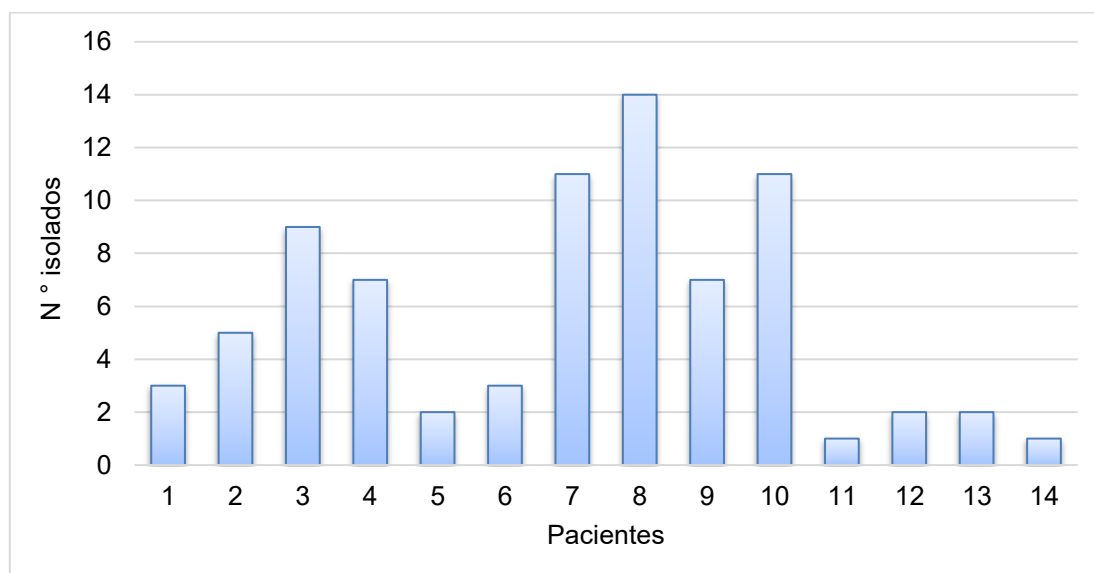
Já para as amostras de pacientes, foi obtido um total de 77 (44,5%) isolados correspondentes às amostras dos 14 pacientes participantes do estudo. A Tabela 2 descreve os isolados bacterianos obtidos para cada paciente, período da coleta (internação ou alta) e, sua amostra correspondente (leito, fezes, *swab* retal). Destaca-se que não foi possível realizar a coleta no período de alta os pacientes 12 e 14 devido à transferência dos pacientes antes do período de coleta, esses dados são ilustrados na Figura 31. Diante disso, conclui-se que 31% dos isolados obtidos nas amostras de pacientes, correspondem ao período de alta e que 69% correspondem ao período de internação hospitalar desses pacientes (Figura 32).

Tabela 2. Descrição dos isolados bacterianos obtidos nas amostras de pacientes.

N° Paciente	Cidade de origem	AMOSTRAS						Total de isolados
		Internação			Alta			
		Fezes	Swab retal	Leito	Fezes	Swab retal	Leito	
1	Caibi	0	3	0	0	0	0	3
2	Videira	5	0	0	0	0	0	5
3	São Miguel do Oeste	9	0	0	0	0	0	9
4	Erval Velho	0	4	0	0	3	0	7
5	Concórdia	2	0	0	0	0	0	2
6	Fraiburgo	3	0	0	0	0	0	3
7	Caibi	0	5	0	0	6	0	11
8	Concórdia	5	0	0	9	0	0	14
9	Irani	0	4	0	0	3	0	7
10	Passos Maia	9	0	0	0	0	1	10
11	São Miguel do Oeste	1	0	0	0	0	0	1
12	São Carlos	-	2	-	-	-	-	2
13	Concórdia	0	0	0	0	2	0	2
14	Fraiburgo	-	1	-	-	-	-	1
		TOTAL						77

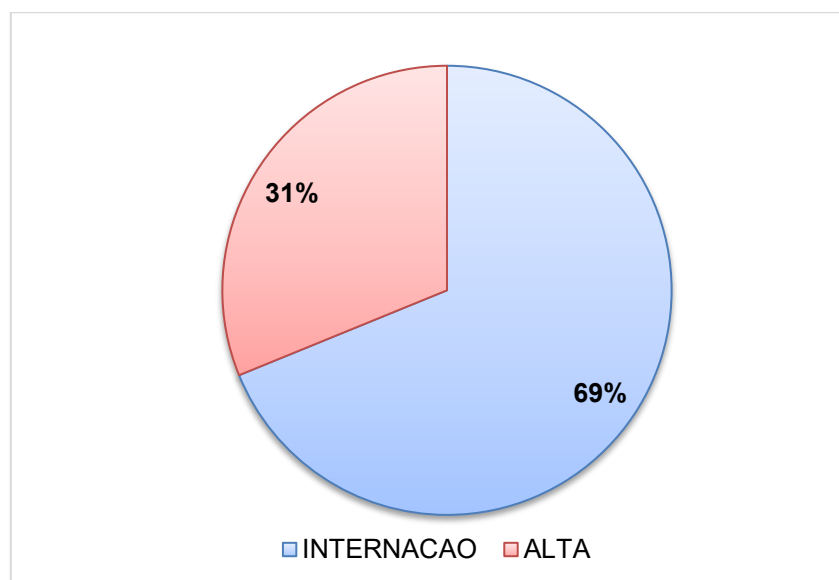
Fonte: autora.

Figura 31. Gráfico do número total de isolados bacterianos obtidos para cada paciente.



Fonte: autora.

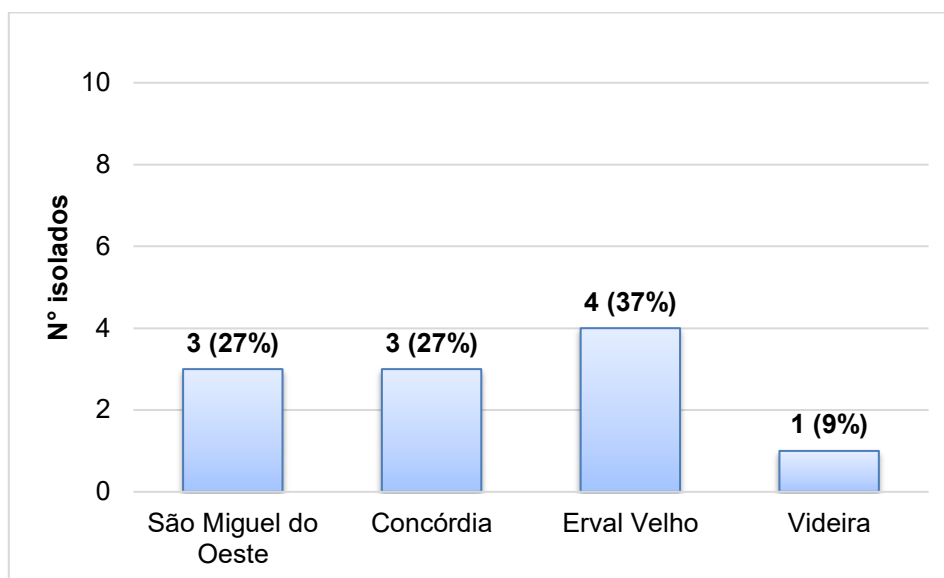
Figura 32. Isolados bacterianos obtidos no período de internação e alta hospitalar dos pacientes.



Fonte:autora.

E por fim, para as amostras de transporte foi obtido um total de 11 (6%) isolados bacterianos, dos quais 3 (27%) correspondem às amostras do transporte da cidade de São Miguel do Oeste, 3 (27%) do transporte da cidade de Concórdia, 4 (37%) do transporte da cidade de Erval Velho e 1 (9%) do transportes da cidade de Videira (Figura 33).

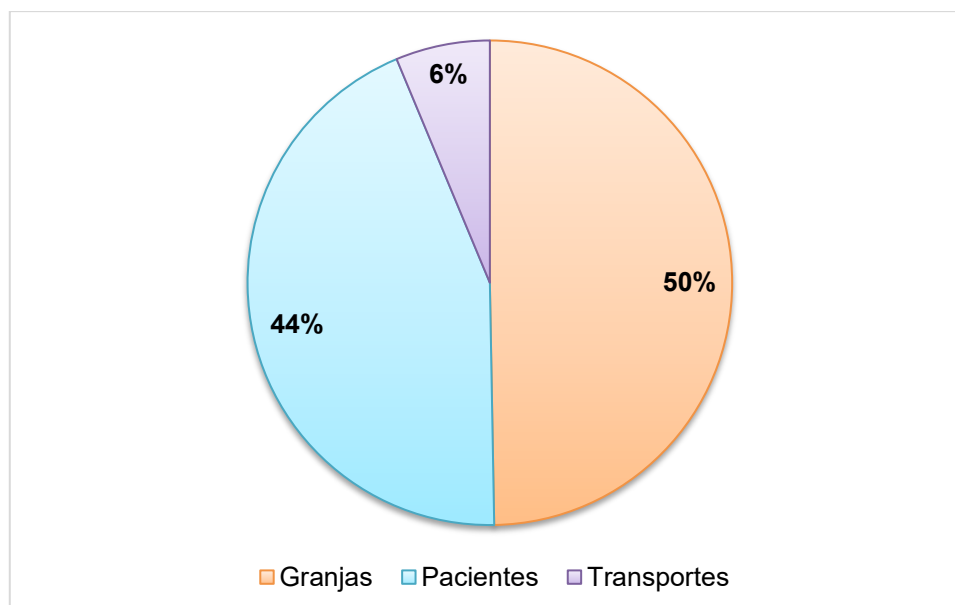
Figura 33. Isolados bacterianos obtidos nas amostras de transportes.



Fonte: autora.

Portanto, observou-se que 11 (6%) dos isolados obtidos correspondem às amostras de transportes, 85 (50%) para as amostras de granjas e 77 (44%) para as amostras de pacientes Figura 34.

Figura 34. Gráfico correspondente ao número total de isolados bacterianos bacilos Gram negativos.



Fonte: autora.

A partir dos dados apresentados, é possível observar que os isolados obtidos exibem certa resistência aos antimicrobianos utilizados para o processo de seleção das amostras (66 para Ceftriaxona; 45 para Meropenem; 56 para

Polimixina B; 65 para Vancomicina e 24 para Cefoxitina), incluindo tanto isolados bacilos Gram-negativos quanto Gram-positivos e uma colônia assacarolítica.

Dispondo da análise dos resultados, atenta-se ao aumento da quantidade de isolados de granjas de suínos orgânicos obtidos após limpeza do local. Resultado este não esperado, devido à utilização de protocolos que estabelecem todo o procedimento de limpeza e desinfecção do local após a saída dos animais. Esse resultado repete-se quando analisado os dados de isolados bacilos Gram-negativos obtidos nestas granjas. Portanto, reiterando a suspeita de baixa efetividade dos procedimentos de limpeza realizados nestes locais.

Segundo a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) (2013), o procedimento de limpeza se baseia, inicialmente, em uma limpeza seca, através da retirada dos dejetos com uma pá e vassoura, esvaziamento das calhas e fossas existentes e, em seguida iniciar a limpeza úmida, no máximo 3 horas após a saída dos animais. Para executar a limpeza, deve-se umedecer com água e detergente o local com auxílio de um lava jato. E por fim, no dia seguinte deve-se aplicar um desinfetante no local totalmente seco. Opcionalmente pode ser feita uma segunda desinfecção, usando pulverização ou nebulização, cerca de 2 horas antes do alojamento dos próximos animais.

Por esse motivo, acredita-se que há uma deficiência no procedimento de limpeza realizado nestas granjas, fazendo-se necessário uma reformulação dos processos executados durante a limpeza, dos desinfetantes utilizados e se os mesmos são utilizados na concentração recomendada pelo fabricante.

Chama-se atenção ao dado de isolados totais obtidos para granjas, pois as granjas de suínos orgânicos apresentaram uma percentagem (63%) superior em relação às amostras de granjas de suínos e aves. Um resultado não previsto devido a menor quantidade de amostras advindas das granjas de suínos orgânicos e, principalmente a presença de um número mais baixo de animais nestas granjas. Assim, a maior proporção de isolados bacterianos obtidos em amostras de granjas de suínos orgânicos, as quais não passaram por nenhum tratamento à base de antimicrobianos, pode ser justificada pelos cuidados e manejos terapêuticos realizados nesses animais e, também pelas características microbiológicas do meio ambiente em que vivem.

Outro dado observado, foi a presença do aumento de isolados obtidos em pacientes em seu período de alta, ou seja, durante o período de internação foram colonizados por bactérias hospitalares. Destacando-se a presença de isolados em maior proporção em amostras de fezes em comparação às amostras obtidos em *swab* retal. Este resultado, pode ser justificado pela diferença de material obtido em cada amostra, ou seja, as amostras de fezes apresentam maior volume e conseqüentemente maior representatividade do perfil de colonização bacteriana desses pacientes, ao contrário das amostras de *swabs* retais, que representam apenas a colonização bacteriana do local de contato do *swab*.

Dos 14 pacientes recrutados apenas em 2 não foram coletadas amostras no período de alta e, desses 12 pacientes com amostras dos períodos de internação e alta, 3 deles apresentaram crescimento no número de isolados, uma representação de 25% das amostras. Esse resultado, caracteriza a influência direta do ambiente na microbiota de cada paciente, já que muitos microrganismos utilizam de diferentes meios e vetores para infectarem. O ambiente hospitalar tem se destacado em relação à presença desses patógenos em seu meio, em conseqüência do acolhimento de pacientes de distintos lugares e dos inúmeros procedimentos clínicos realizados.

Por fim, salienta-se a presença predominante de isolados de bacilos Gram- negativos, os quais representam 68% do total de isolados. Um resultado alarmante, em razão de ser o grupo de bactérias que causam as principais infecções clínicas e assim, consideradas uma ameaça iminente à saúde pública. Destaca-se que as bactérias Gram-negativas são mais difíceis de combater, devido à sua alta prevalência de resistência intrínseca aos antimicrobianos e, que a única nova classe de antimicrobiano descoberta nos últimos 30 anos, a teixobactina, não atua contra as bactérias Gram-negativas (LING *et al.*, 2015). Assim, enfatiza-se a importância clínica desse grupo de bactéria dentro da saúde pública.

5.3 Identificação por MALDI-TOF

Para a identificação de todos os isolados foi realizada a metodologia MALDI-TOF, a qual utiliza espectrometria de massa para avaliar o perfil proteico

da amostra, permitindo a identificação baseada em um banco de dados de perfis conhecidos. Os resultados obtidos foram analisados através dos 10 *matches* de microrganismos encontrados e, principalmente pelo *score* obtido pelo *software MALDI Biotyper 3.0 Compass*, o qual indica a escala de confiabilidade do resultado, ou seja, um *score* de 2.00-3.00: alta confiabilidade, de 1,70-1.99: baixa confiabilidade e por fim, de 0.00- 1.69: sem possibilidade de identificação. Os *scores* obtidos para cada amostra são descritos no **APÊNDICE C**.

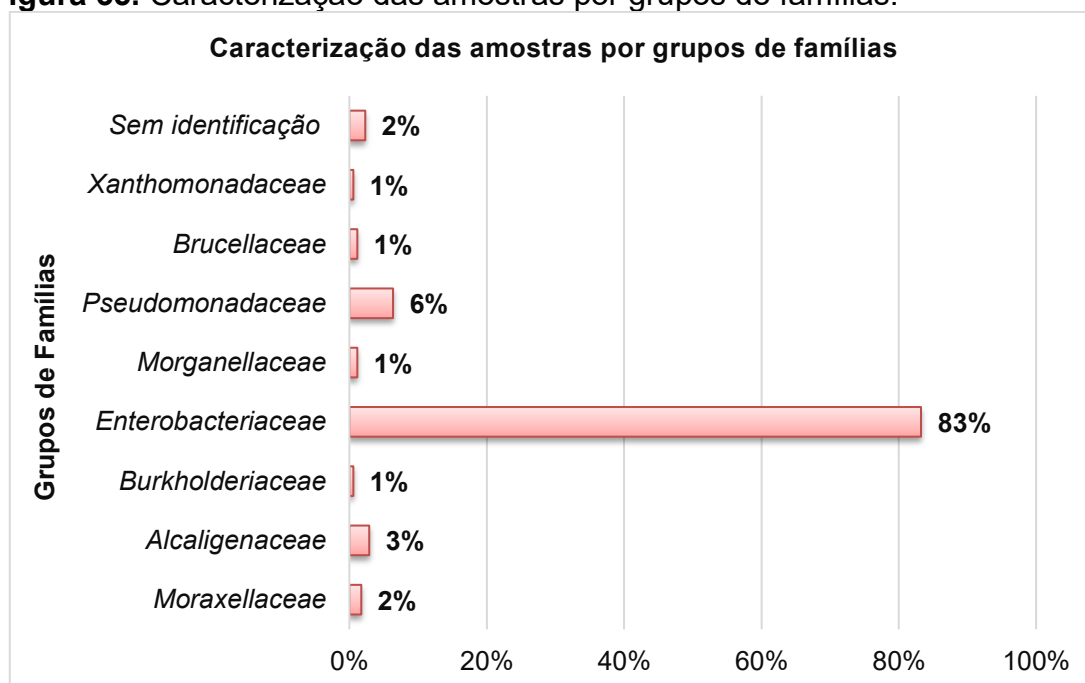
Para os 173 isolados foram encontrados majoritariamente *Escherichia coli* (51%), a qual é caracterizada como um microrganismo de grande predominância em amostras de caráter clínico e/ou de origem fecal. Em menor expressão, registra-se a ocorrência de *Acinetobacter baumannii* (1%), *Acinetobacter gernerii* (1%), *Acinetobacter* sp. (1%), *Alcaligenes faecalis* (3%), *Burkholderia cepacia* (1%), *Citrobacter braakii* (2%), *Citrobacter freundii* (1%), *Citrobacter sedlakii* (1%), *Cronobacter* sp. (1%), *Enterobacter cloacae* (3%), *Enterobacter xiangfangensis* (1%), *Franconibacter pulveris* (1%), *Hafnia alvei* (1%), *Klebsiella aerogenes* (1%), *Klebsiella oxytoca* (1%), *Klebsiella pneumoniae* (3%), *Leclercia adecarboxylata* (1%), *Morganella morganii* (4%), *Ochrobactrum intermedium* (1%), *Pantoea agglomerans* (2%), *Proteus hauseri* (3%), *Proteus mirabilis* (5%), *Proteus penneri* (1%), *Proteus vulgaris* (1%), *Providencia rettgeri* (1%), *Providencia stuartii* (1%), *Pseudomonas brassicacearum* (1%), *Pseudomonas chlororaphis* (1%), *Pseudomonas guariconensis* (1%), *Pseudomonas monteillii* (5%), *Stenotrophomonas maltophilia* (1%) e, por fim, 2% das amostras não foram possíveis de identificar (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Portanto, caracterizou-se as amostras conforme a classificação dos grupos de famílias, no qual predominantemente 83% das amostras pertencem à família *Enterobacteriaceae*. Observou-se com menor presença, 1% para *Xanthomonadaceae*, 1% *Brucellaceae*, 6% *Pseudomonadaceae*, 1% *Morganellaceae*, 1% *Burkholderiaceae*, 3% *Alcaligenaceae*, 2% *Moraxellaceae* e, por fim 2% não foram identificadas, não sendo possível a caracterização da classe de família (Figura 35 e **Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Ressalta-se que a não identificação de determinadas amostras, pode ser justificada pelas características das amostras, as quais supostamente são

amostras de caráter ambiental, assim, não sendo compatíveis com o banco de dados do MALDI-TOF utilizado, que apresenta banco de dados restrito para microrganismos de caráter clínico. Entretanto, os dados espectrais foram gerados e futuramente poderão ser avaliados em bancos de dados mais abrangentes.

Figura 35. Caracterização das amostras por grupos de famílias.



Fonte: autora.

A partir da identificação de cada isolado foi possível descrever a microbiota de cada tipo de amostra coletada, ou seja, foi analisado o conjunto de microrganismos presentes nos determinados ambientes.

Nas amostras de transportes foram identificados 2 isolados de *Cronobacter* sp. (18,2%), 1 isolado de *Enterobacter cloacae* (9%), 2 isolados de *Enterobacter xiangfangensis* (18,2%), 2 isolados de *Franconibacter pulveris* (18,2%), 1 isolado de *Leclercia adecarboxylata* (9%) e por fim, 3 isolados de *Pantoea agglomerans* (27,3%).

Para as amostras de pacientes foi identificado 1 isolado de *Acinetobacter baumannii* (1,3%), 3 isolados de *Citrobacter braakii* (3,9%), 1 isolado de *Citrobacter freundii*, 1 isolado de *Citrobacter sedlakii* (1,3%), 4 isolados de *Enterobacter cloacae* (5,2%), 53 isolados de *Escherichia coli* (68,8%), 2 isolados de *Hafnia alvei* (2,6%), 1 isolado de *Klebsiella aerogenes* (1,3%), 1 isolado de

Klebsiella oxytoca (1,3%), 6 isolados de *Klebsiella pneumoniae* (7,8%), 2 isolados de *Morganella morganii* (2,6%), 1 isolado de *Proteus mirabilis* (1,3%) e por fim, 1 isolado de *Providencia stuartii* (1,3%).

Já para as amostras de granjas de aves foram identificados 5 isolados de *Escherichia coli* (41,7%) e 7 isolados de *Pseudomonas monteilii* (58,3%) e, para amostras de granjas de suínos foram identificados 1 isolado de *Acinetobacter* sp. (5,3%), 5 isolados de *Alcaligenes faecalis* (26,3%), 6 isolados de *Escherichia coli* (31,6%), 1 isolado de *Morganella morganii* (5,3%), 4 isolados de *Proteus mirabilis* (21%), 1 isolado de *Proteus penneri* (5,3%) e 1 isolado não foi possível de identificar (5,3%).

E por fim, para as amostras de granjas de suínos orgânicos, as mesmas foram analisadas conforme os períodos de coletas realizados (antes da limpeza e após limpeza), assim, nas amostras obtidas antes do procedimento de limpeza foram identificados 1 isolado de *Acinetobacter gernerii* (4,8%), 1 isolado de *Burkholderia cepacia* (4,8%), 10 isolados de *Escherichia coli* (47,6%), 1 isolado de *Morganella morganii* (4,8%), 2 isolados de *Proteus hauseri* (9,5%), 3 isolado de *Proteus mirabilis* (14,3%), 1 isolado de *Pseudomonas monteilii* (4,8%), 1 isolado de *Stenotrophomonas maltophilia* (4,8%) e 1 isolado não foi possível de ser identificado (4,8%).

Já para amostras obtidas após o procedimento de limpeza foram identificados 14 isolados de *Escherichia coli* (42,4%), 3 isolados de *Morganella morganii* (9%), 2 isolados de *Ochrobactrum intermedium* (6%), 4 isolados de *Proteus hauseri* (12%), 1 isolado de *Proteus mirabilis* (3%), 1 isolado de *Proteus penneri* (3%), 2 isolados de *Proteus vulgaris* (6%), 1 isolado de *Providencia rettgeri* (3%), 1 isolado de *Pseudomonas brassicacearum* (3%), 1 isolado de *Pseudomonas chlororaphis* (3%), 1 isolado de *Pseudomonas guariconensis* (3%) e 2 isolados não foram possíveis de serem identificados. Os dados obtidos estão descritos no Tabela 3.

Tabela 3. Identificação dos isolados obtidos de cada tipo de amostra.

Classificação por ordem	Classificação Família	Microrganismos identificados	Número de isolados obtidos							
			Transporte	Paciente	Granja aves	Granja suínos	Granja orgânicos Antes da Limpeza	Granja orgânicos Após Limpeza	Total	(%)
Bacilos Gram-negativos Não Fermentadores de glicose	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	1	0	0	0	0	1	1%
		<i>Acinetobacter gernerii</i>	0	0	0	0	1	0	1	1%
		<i>Acinetobacter</i> sp.	0	0	0	1	0	0	1	1%
	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0	0	0	5	0	0	5	3%
	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	0	0	0	0	1	0	1	1%
	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	0	0	0	0	0	1	1	1%
		<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	0	0	0	0	0	1	1	1%
		<i>Pseudomonas guariconensis</i>	0	0	0	0	0	1	1	1%
		<i>Pseudomonas monteillii</i>	0	0	7	0	1	0	8	5%
	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	0	0	1	0	1	1%
<i>Brucellaceae</i>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	0	0	0	0	0	2	2	1%	
Enterobacterales	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter braakii</i>	0	3	0	0	0	0	3	2%
		<i>Citrobacter freundii</i>	0	1	0	0	0	0	1	1%
		<i>Citrobacter sedlakii</i>	0	1	0	0	0	0	1	1%
		<i>Cronobacter</i> sp.	2	0	0	0	0	0	2	1%
		<i>Enterobacter cloacae</i>	1	4	0	0	0	0	5	3%
		<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	2	0	0	0	0	0	2	1%
		<i>Escherichia coli</i>	0	53	5	6	10	14	88	51%
		<i>Franconibacter pulveris</i>	2	0	0	0	0	0	2	1%
		<i>Hafnia alvei</i>	0	2	0	0	0	0	2	1%
		<i>Klebsiella aerogenes</i>	0	1	0	0	0	0	1	1%
Enterobacterales	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	1	0	0	0	0	1	1%

		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	6	0	0	0	0	6	3%
		<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1	0	0	0	0	0	1	1%
		<i>Morganella morganii</i>	0	2	0	1	1	3	7	4%
		<i>Pantoea agglomerans</i>	3	0	0	0	0	0	3	2%
		<i>Proteus hauseri</i>	0	0	0	0	2	4	6	3%
		<i>Proteus mirabilis</i>	0	1	0	4	3	1	9	5%
		<i>Proteus penneri</i>	0	0	0	1	0	1	2	1%
		<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	0	0	0	2	2	1%
	<i>Morganellaceae</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	0	0	0	0	0	1	1	1%
		<i>Providencia stuartii</i>	0	1	0	0	0	0	1	1%
-	-	Sem identificação	0	0	0	1	1	2	4	2%
Total			11	77	12	19	21	33	173	100%

Fonte: autora.

O resultado encontrado, assemelha-se com os dados da literatura científica, no qual é possível destacar a presença majoritariamente de *Escherichia coli*, uma bactéria que habita principalmente o trato intestinal inferior de animais de sangue quente, incluindo os humanos e, é frequentemente liberada para o meio ambiente por meio das fezes ou efluentes de águas residuais. A presença de *Escherichia coli* em águas ambientais há muito tempo é considerada um indicador de poluição fecal recente. No entanto, há vários estudos recentes que relatam que algumas cepas específicas de *Escherichia coli* podem sobreviver por longos períodos de tempo e, potencialmente se reproduzem em ambientes extraintestinais. Isso indica que a *Escherichia coli* pode ser integrada às mais diversas comunidades e, assim, a sua presença no ambiente é bem reconhecida hoje em dia (JANG *et al.*, 2017).

E por último, evidencia-se a comparação dos microrganismos identificados nas granjas de suínos orgânicos nos períodos de coleta antes da limpeza e após limpeza, onde foi encontrado um número superior de isolados no período de após limpeza e com uma grande variedade de espécies, assim, aponta-se que o procedimento de limpeza é realizado de forma inefetiva, sendo necessário uma reavaliação dos processos executados.

5.4 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

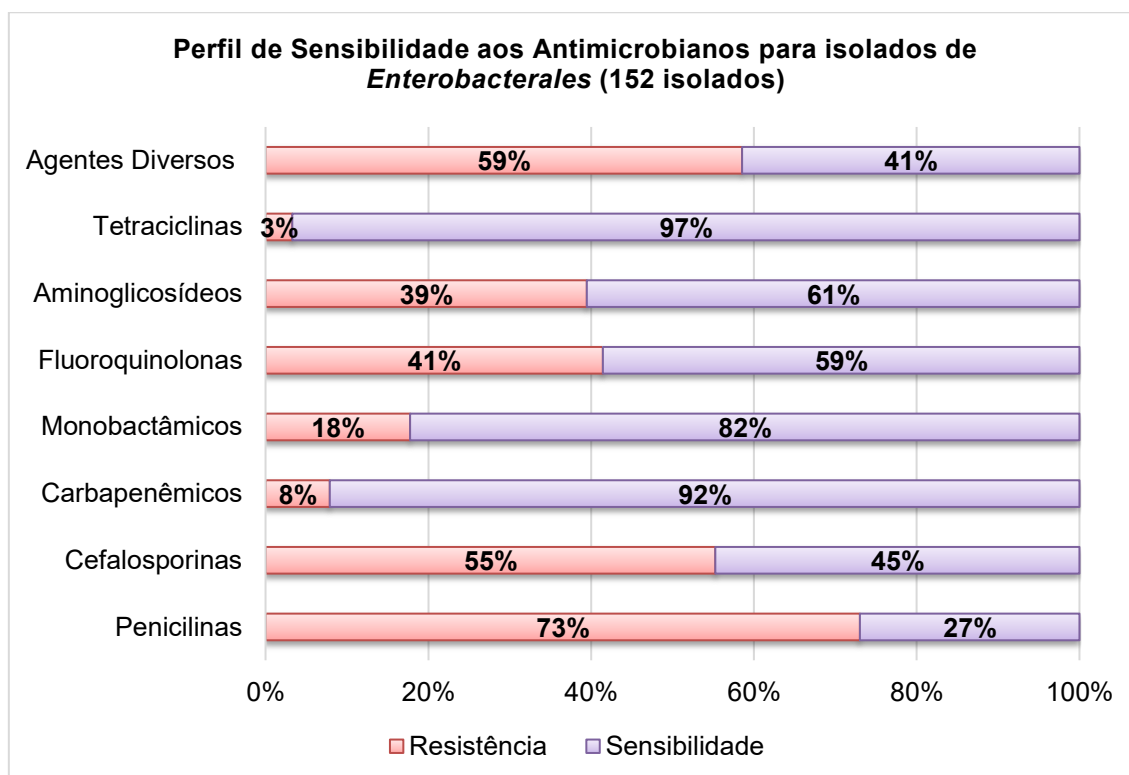
5.4.1 Perfil de Sensibilidade aos antimicrobianos para as amostras de *Enterobacterales*

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos 173 isolados obtidos, foi definido através do Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA). Inicialmente o teste foi realizado apenas para os 152 isolados da ordem *Enterobacterales*. A interpretação dos resultados foi realizada a partir da tabela de pontos de cortes para *Enterobacterales*, preconizada pelo BrCAST.

Para as bactérias fermentadoras de glicose observou-se que os isolados apresentaram resistência às seguintes classes de antimicrobianos: 73% às Penicilinas, 55% às Cefalosporinas, 8% aos Carbapenêmicos, 18% aos Monobactâmicos, 41% às Fluoroquinolonas, 39% aos Aminoglicosídeos, 3% às

tetraciclinas e 59% à classe de Agentes Diversos (Fosfomicina 200 µg, Nitrofurantoina 100 µg e Sulfametoxazol +Trimetoprim 23,75/1,25 µg) a qual é definida pelo BrCAST (Figura 36).

Figura 36. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os isolados de *Enterobacterales*



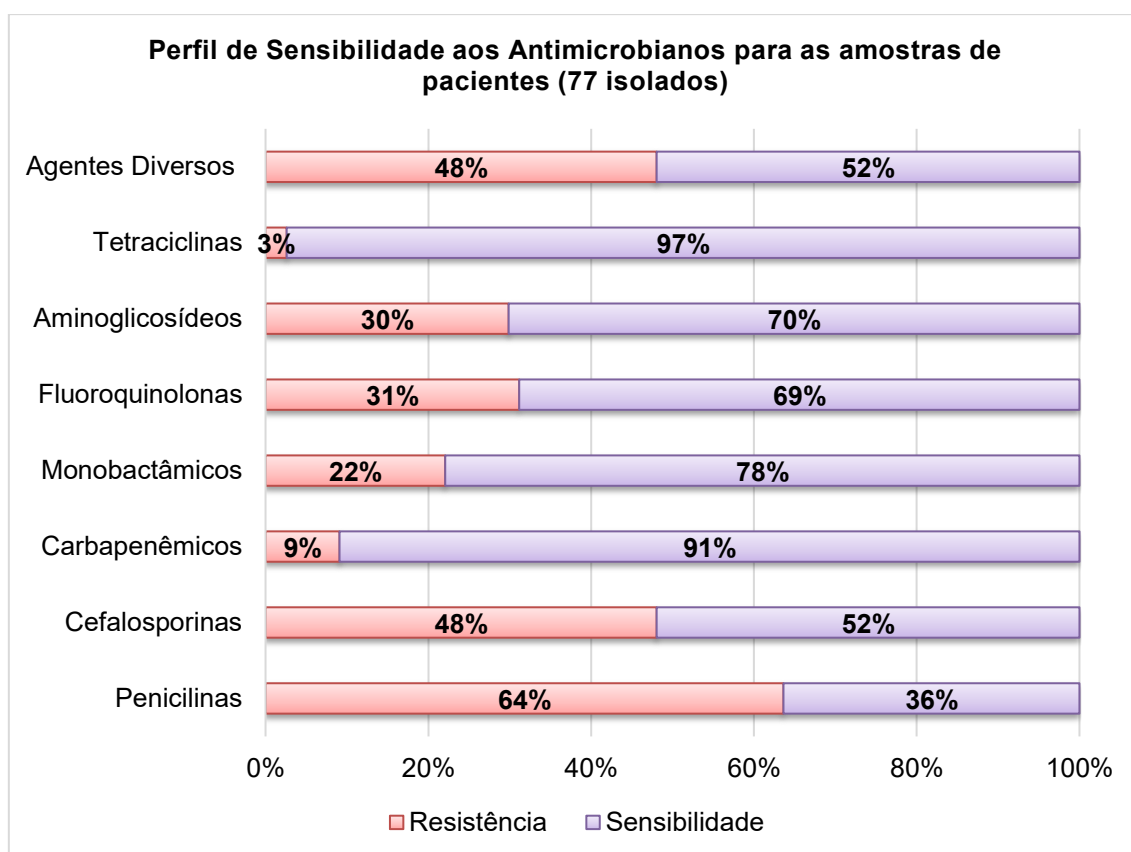
Fonte: autora.

Isolados resistentes foram observados com maior prevalência para as classes das penicilinas e cefalosporinas. Um resultado esperado, já que segundo à farmacoterapia utilizada pelos pacientes durante o período de internação (Ceftriaxona, Cefazolina, Piperacilina + Tazobactam, Amoxicilina + Ácido Clavulânico) e, em procedimentos clínicos realizados nos animais das granjas, essas mesmas classes foram as mais prescritas, isto significa, que há uma relação direta entre a antibioticoterapia e a manifestação de resistência bacteriana.

Para maior percepção das resistências presentes nas amostras, é possível descrever estas resistências a partir de cada tipo de amostra analisada. Portanto, nota-se que dos 77 isolados de pacientes, 64% deles apresentaram resistência à classe das Penicilinas, 48% às Cefalosporinas, 9% aos Carbapenêmicos, 22% aos Monobactâmicos, 31% às Fluoroquinolonas, 30%

aos Aminoglicosídeos, 3% às Tetraciclinas e, por fim, 48% aos Agentes Diversos (Fosfomicina 200 µg, Nitrofurantoina 100 µg e Sulfametoxazol +Trimetoprim 23,75/1,25 µg) (Figura 37). Deste modo, esses resultados são semelhantes em parte, aos resultados descritos anteriormente, ou seja, obteve-se permanência do domínio de sensibilidade em todas as classes de antimicrobianos, exceto para as classes das Cefalosporinas, a qual apresentou um domínio de resistência quando comparado aos dados gerais obtidos para as amostras de granjas e transportes. Assim, evidencia-se novamente que a farmacoterapia é a principal influência para os achados de resistência bacteriana nas amostras testadas.

Figura 37. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os isolados de *Enterobacterales* em amostras de pacientes.



Fonte: autora.

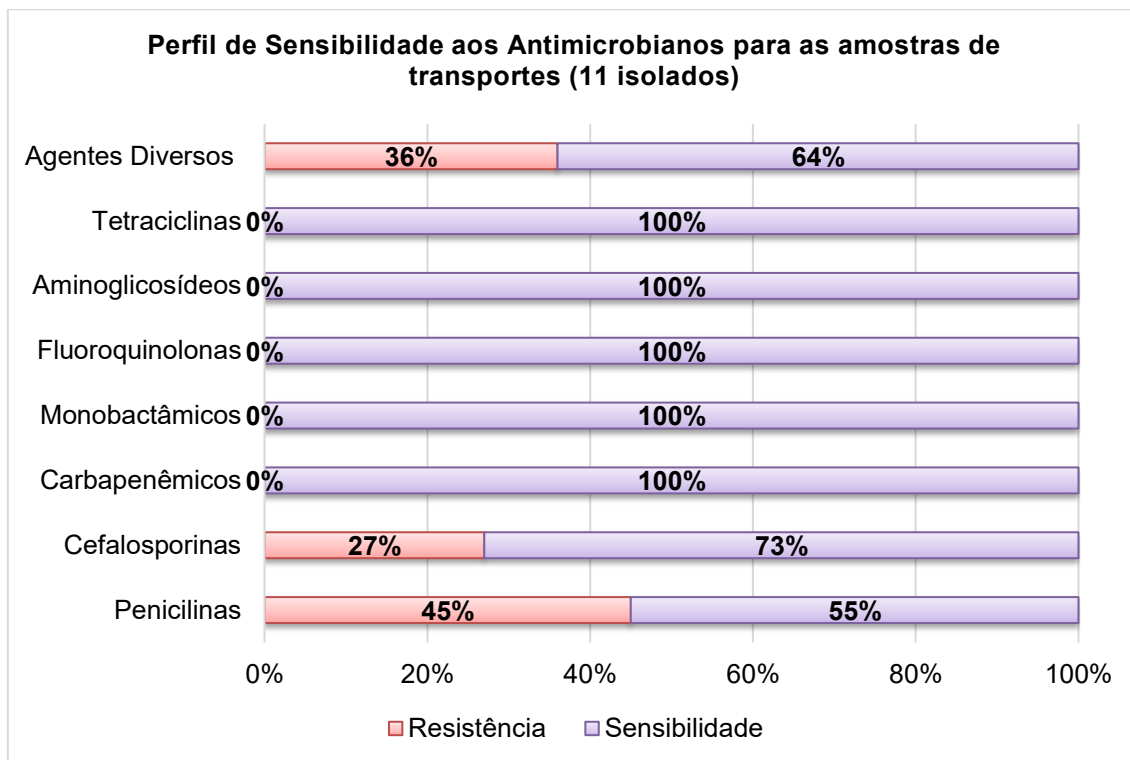
Outras observações relevantes para as amostras de pacientes é, que o paciente 2 destacou-se pela presença de um perfil amplo de resistência, ou seja, 3 dos 5 isolados totais obtidos para tal paciente, apresentaram resistência à todos os fármacos de todas as classes de antimicrobianos, exceto ao único

fármaco da classe das tetraciclina testado (Tigeciclina) e a norfloxacina da classe das Fluoroquinolonas, definindo esses isolados como XDR (*Extensively drug-resistant*), ou seja, significa que o grupo de isolados apresentou resistência à quase todos os antimicrobianos testados, segundo a definição de Magiorakos e colaboradores (2012).

O perfil de resistência encontrado, pode ser justificado, novamente pela farmacoterapia vigente, porém, este paciente apresenta um histórico de inúmeras internações durante a sua vida, assim, a longa permanência no ambiente hospitalar e a dependência à diversos procedimentos clínicos invasivos, potencializaram o aparecimento de resistências bacterianas e, tornando este paciente um potencial vetor de transmissão de possíveis genes de resistência.

Já para as amostras de transportes percebe-se um perfil de resistência diferente em comparação aos perfis descritos anteriormente. Dos 11 isolados de transportes, 45% deles apresentaram resistência à classe das Penicilinas, 27% às Cefalosporinas e 36% aos Agentes Diversos (Fosfomicina 200 µg, Nitrofurantoina 100 µg e Sulfametoxazol +Trimetoprim 23,75/1,25 µg), para as outras classes não possível detectar possíveis resistências (Figura 38). Assim, a partir desses resultados, os transportes utilizados por diferentes pacientes e funcionários podem ser considerados um importante meio transmissor de microrganismos resistentes aos antimicrobianos. Portanto, ressalta-se a necessidade de melhor higienização desses transportes, podendo ser seguido protocolos para transportes de caráter emergencial, como preconizado por (SCIH / CCIH, 2007).

Figura 38. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os isolados de *Enterobacterales* nas amostras transportes.

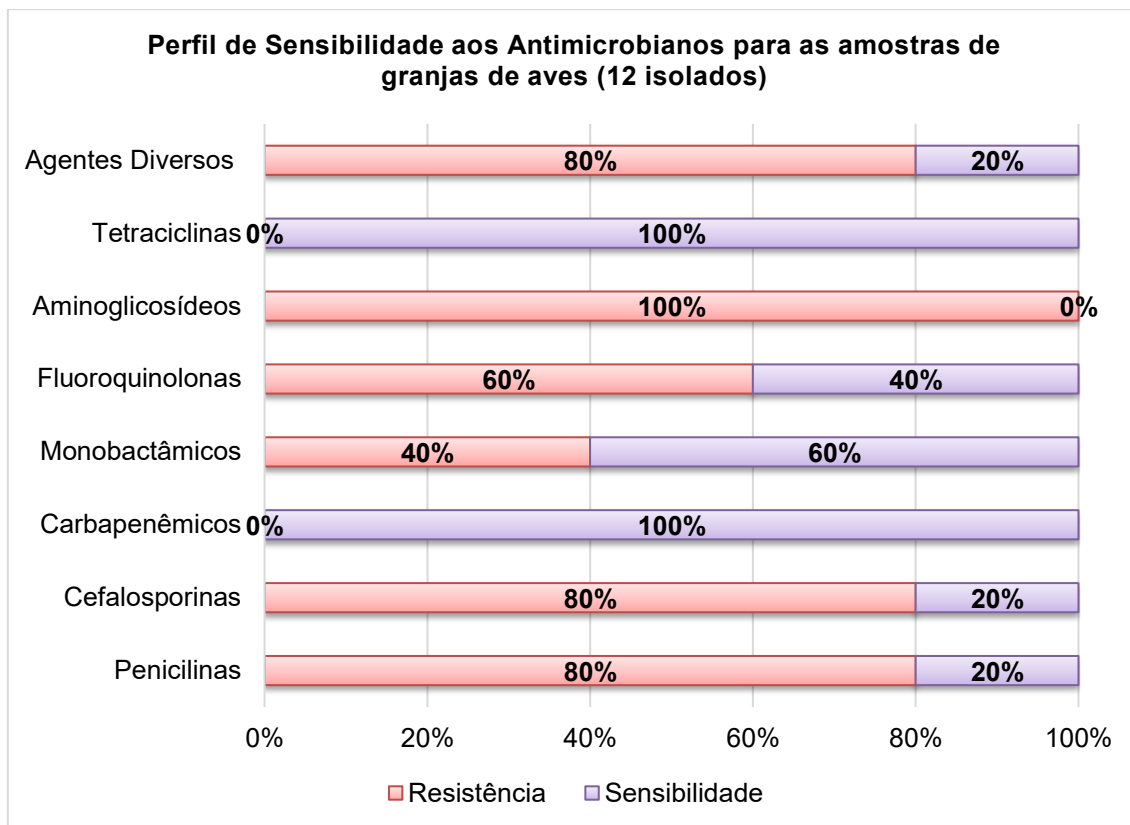


Fonte: autora.

Os resultados obtidos para as amostras de granjas são expostos de forma descritiva para cada tipo de granja coletada.

Inicialmente, para as amostras de granjas de aves foi possível observar a partir dos 12 isolados obtidos, que 80% deles apresentaram resistência à classe das Penicilinas, 80% às Cefalosporinas, 40% aos Monobactâmicos, 60% às Fluoroquinolonas, 100% aos Aminoglicosídeos e 80% aos Agentes Diversos (Fosfomicina 200 µg, Nitrofurantoina 100 µg e Sulfametoxazol +Trimetoprim 23,75/1,25 µg). Não foi identificada resistência à classe dos Carbapenêmicos e Tetraciclinas (Figura 39).

Figura 39. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os isolados de *Enterobacterales* nas amostras de granjas de aves.



Fonte: autora.

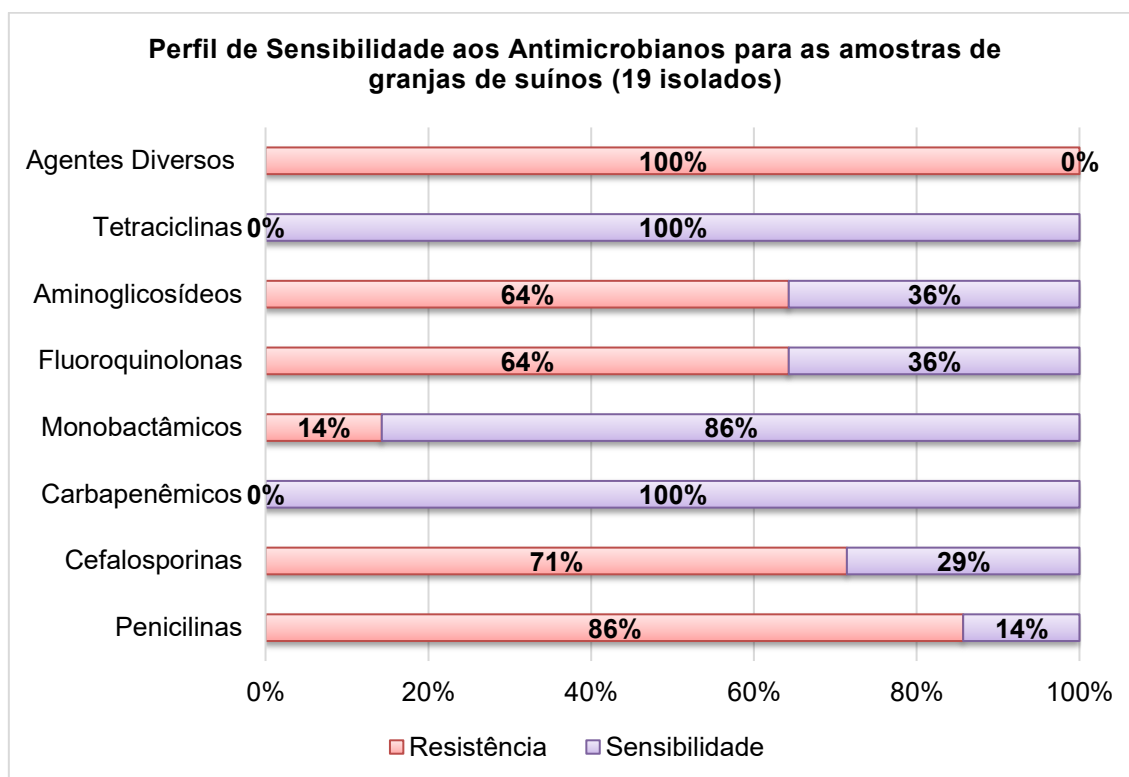
Diante disso, constata-se que as resistências bacterianas encontradas nas amostras de isolados de granjas de aves correspondem aos antimicrobianos utilizados no tratamento dos animais. Desse modo, outra vez coloca-se em evidência a atuação direta da farmacoterapia adotada e o surgimento de mecanismos de resistência.

Outra análise a ser feita, é em relação ao número elevado de animais presentes em um mesmo local, ou seja, sabe-se que uma superpopulação seja da mesma espécie ou não, pode potencializar o aparecimento de novas doenças e diversos mecanismos de resistência bacteriana.

Por seguinte, para as amostras de granjas de suínos foi possível observar a partir dos 19 isolados obtidos, que 86% deles apresentaram resistência à classe das Penicilinas, 71% às Cefalosporinas, 14% aos Monobactâmicos, 64% às Fluoroquinolonas, 64% aos Aminoglicosídeos e 100% aos Agentes Diversos (Fosfomicina 200 µg, Nitrofurantoina 100 µg e Sulfametoxazol +Trimetoprim

23,75/1,25 µg), não sendo encontrada resistência à classe dos Carbapenêmicos e Tetraciclínas (Figura 40).

Figura 40. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os isolados de *Enterobacterales* nas amostras de granjas de suínos.



Fonte: autora.

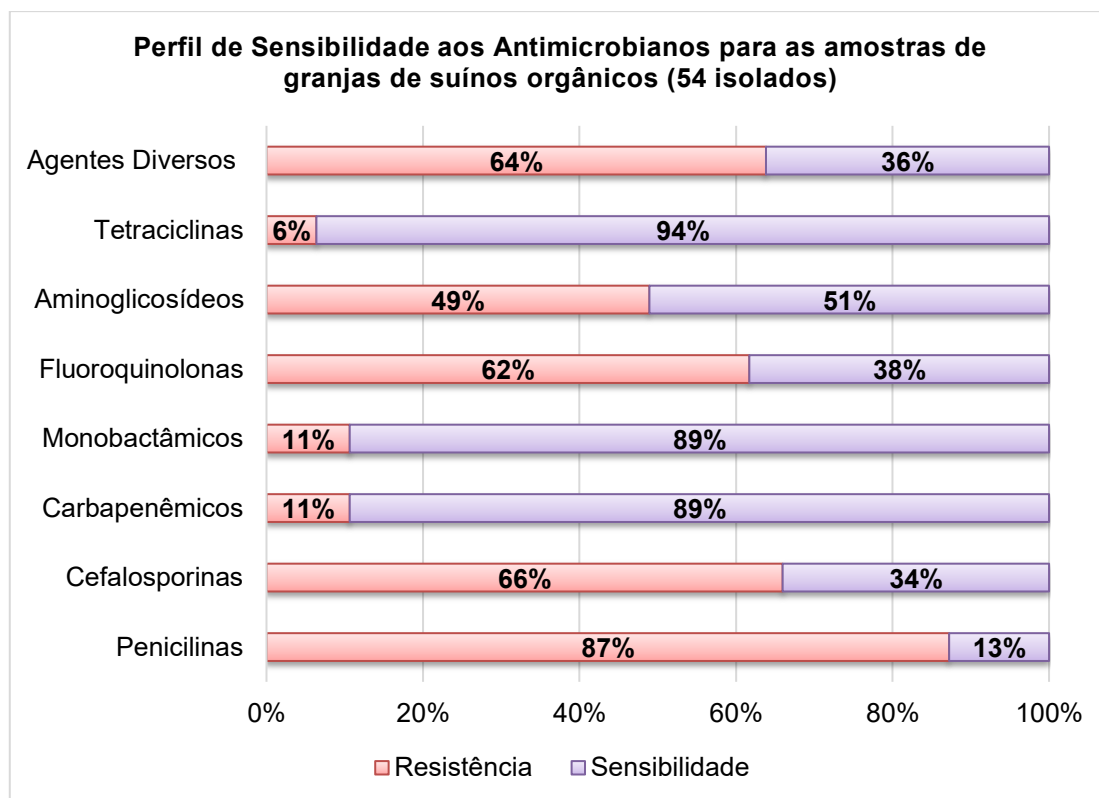
Foi possível destacar o domínio da resistência aos Agentes Diversos, devido principalmente à resistência encontrada para o agente antimicrobiano, Sulfametoxazol + Trimetoprim. Esses fármacos são principais ativos presente na farmacoterapia desses animais, juntamente com as demais classes que apresentaram resistência bacteriana, como as Cefalosporinas e Penicilinas. Ressalta-se que não foi observada resistência à classe dos Carbapenêmicos, podendo ser justificado pela não utilização destes fármacos na clínica dos animais.

Por fim, a não identificação de resistência à classe das tetraciclínas, pode ser devido à testagem de um único agente pertencente à esta classe, a Tigeciclina, sendo necessária uma ampliação dos agentes à serem testados para essa classe, assim, estendendo o alcance de identificação de possíveis mecanismos de resistência, já que para estes animais foram realizados

tratamentos farmacológicos a base de Tetraciclina, não sendo informado o agente utilizado.

E, finalmente para as amostras de granjas de suínos orgânicos foi possível observar a partir dos 54 isolados obtidos, que 87% deles apresentaram resistência à classe das Penicilinas, 66% às Cefalosporinas, 11% aos Carbapenêmicos, 11% aos Monobactâmicos, 62% às Fluoroquinolonas, 49% aos Aminoglicosídeos, 6% às Tetracilinas e 64% aos Agentes Diversos (Fosfomicina 200 µg, Nitrofurantoina 100 µg e Sulfametoxazol +Trimetoprim 23,75/1,25 µg) (Figura 41).

Figura 41. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para os isolados de *Enterobacterales* nas amostras de granjas de suínos orgânicos.



Fonte: autora.

Desta maneira, para as amostras de granjas de suínos orgânicos as resistências observadas, correspondem às principais classes de antimicrobianos utilizados na clínica convencional, porém, não são realizados tratamentos farmacológicos a base de antimicrobianos nos animais presentes nas granjas de suínos orgânicos. Diante do exposto, tais resultados apontam à possível

transmissão transversal de genes de resistência bacteriana entre homem, animal e o meio ambiente presente.

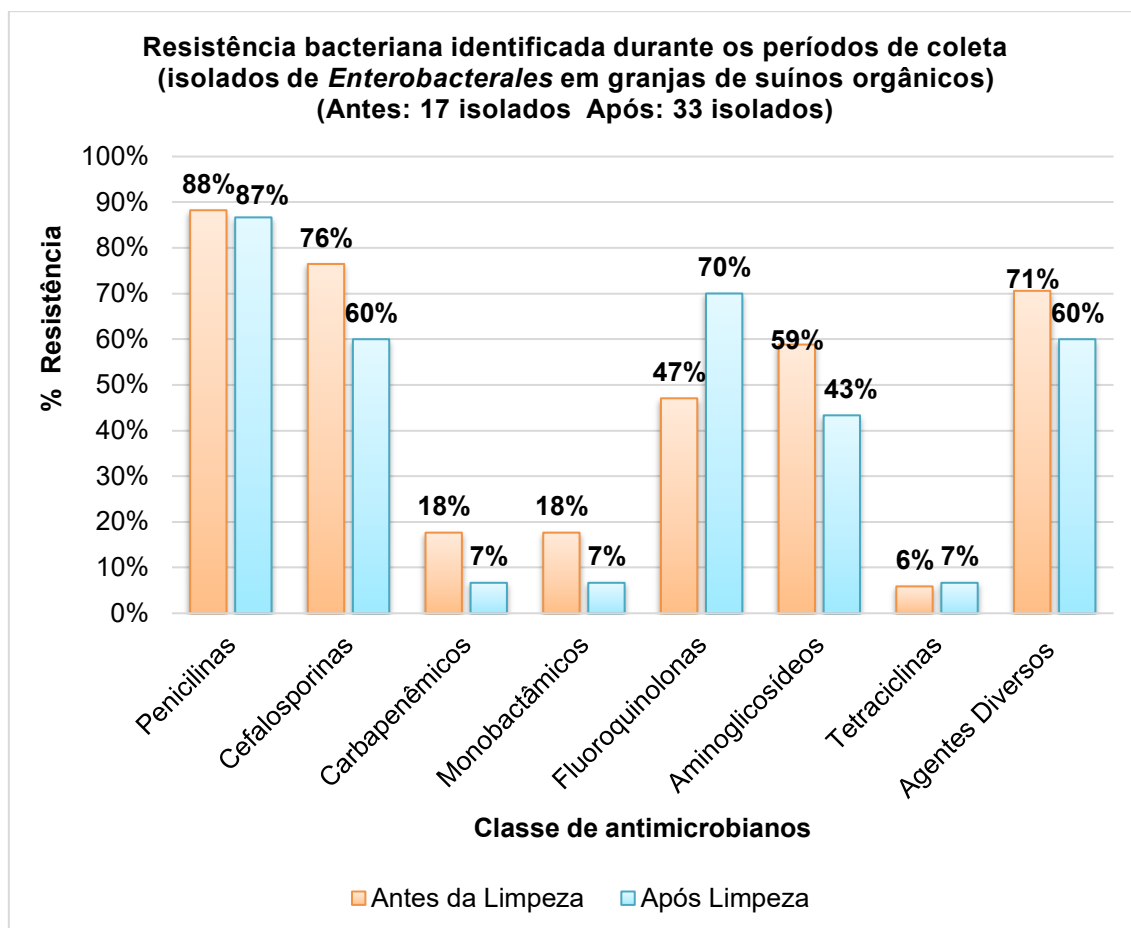
Outro dado relevante, é que apesar do menor número de amostras obtidas para as granjas de suínos orgânicos, obteve-se um maior número de isolados em comparação aos outros tipos de amostras, destacando o potencial crescimento de microrganismo nestes locais.

Com a comparação do perfil de resistência bacteriana aos antimicrobianos encontrado nos dois períodos de coletas realizados para essas amostras, foi possível compreender a atuação das resistências bacterianas, diante a utilização de técnicas de desinfecção nos locais de abrigo dos animais.

Para os 17 isolados fermentadores de glicose obtidos no período antes da limpeza, foi observado que 88% deles apresentaram resistência à classe das Penicilinas, 76% às Cefalosproinas, 18% aos Carbapenêmicos, 18% aos Monobactâmicos, 47% às Fluoroquinolonas, 59% aos Aminoglicosídeos, 6% às Tetraciclina e 71% aos Agentes Diversos (Fosfomicina 200 µg, Nitrofurantoina 100 µg e Sulfametoxazol +Trimetoprim 23,75/1,25 µg).

E já, para os 33 isolados obtidos no período após limpeza, constatou-se que 87% deles apresentaram resistência à classe das Penicilinas, 60% às Cefalosproinas, 7% aos Carbapenêmicos, 7% aos Monobactâmicos, 70% às Fluoroquinolonas, 43% aos Aminoglicosídeos, 7% às Tetraciclina e 60% aos Agentes Diversos (Fosfomicina 200 µg, Nitrofurantoina 100 µg e Sulfametoxazol +Trimetoprim 23,75/1,25 µg). Tais dados descritos, são ilustrados na Figura 42.

Figura 42. Resistência bacteriana identificada em isolados de *Enterobacterales* obtidos durante os períodos de coleta das amostras de granjas de suínos orgânicos.



Fonte: autora.

Tendo em vista os resultados apresentados, é possível observar o aumento de isolados resistentes para a classe das Fluoroquinolonas e Tetraciclina após o procedimento de limpeza realizado nas granjas. Esses resultados indicam uma baixa qualidade dos procedimentos de limpeza utilizados, sendo necessário uma reavaliação das estratégias adotadas para a desinfecção dos locais de abrigo desses animais, para possibilitar a diminuição de microrganismos, como já discutido no tópico 5.1, o qual apresenta resultados e observações semelhantes. Assim, seria possível diminuir a propagação de microrganismo, evitando a disseminação de genes de resistências que esses possam vir apresentar.

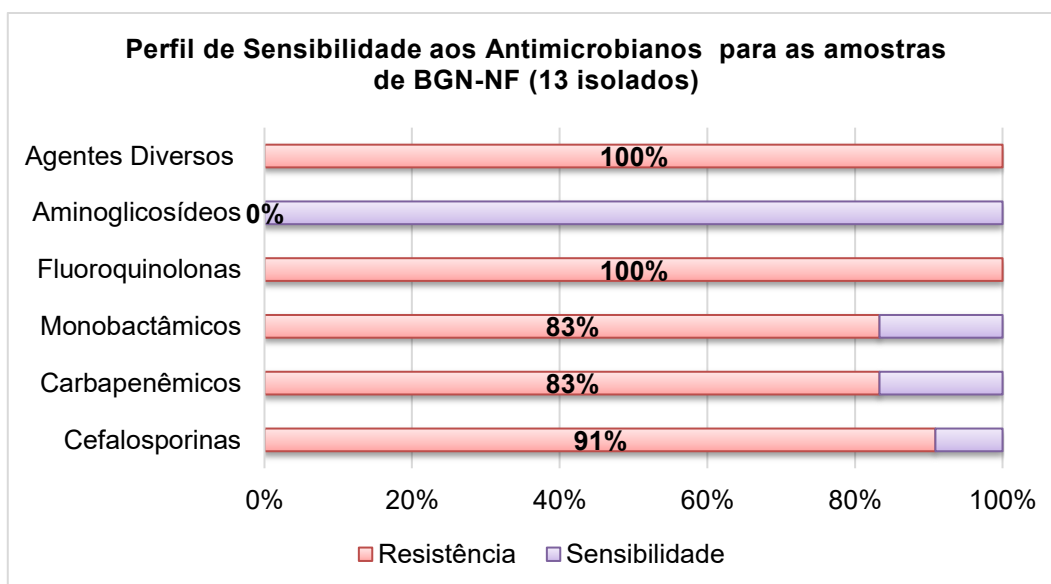
Os resultados obtidos com o teste juntamente com as identificações realizadas pelo MALDI-TOF e as resistências intrínsecas presentes conforme as tabelas do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) são ilustradas no APÊNDICE D.

5.4.2 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos para as amostras de Bacilos Gram negativo não fermentadores de glicose (BGN-NF)

Foram testadas 13 amostras de bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose (BGN-NF) que apresentam ponto de corte determinado pelo BrCAST, utilizando-se as tabelas de ponto de corte clínico para *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter* spp.

Para as amostras de BGN-NF observou-se que os isolados apresentaram resistência às seguintes classes de antimicrobianos: 91% às Cefalosporinas, 83% aos Carbapenêmicos, 83% aos Monobactâmicos, 100% às Fluoroquinolonas e 100% à classe de Agentes Diversos (Sulfametoxazol + Trimetoprim), a qual é definida pelo BrCAST. Não foi encontrada resistência para à classe dos Aminoglicosídeos (Figura 43).

Figura 43. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para as amostras de BGN-NF.



Fonte: autora.

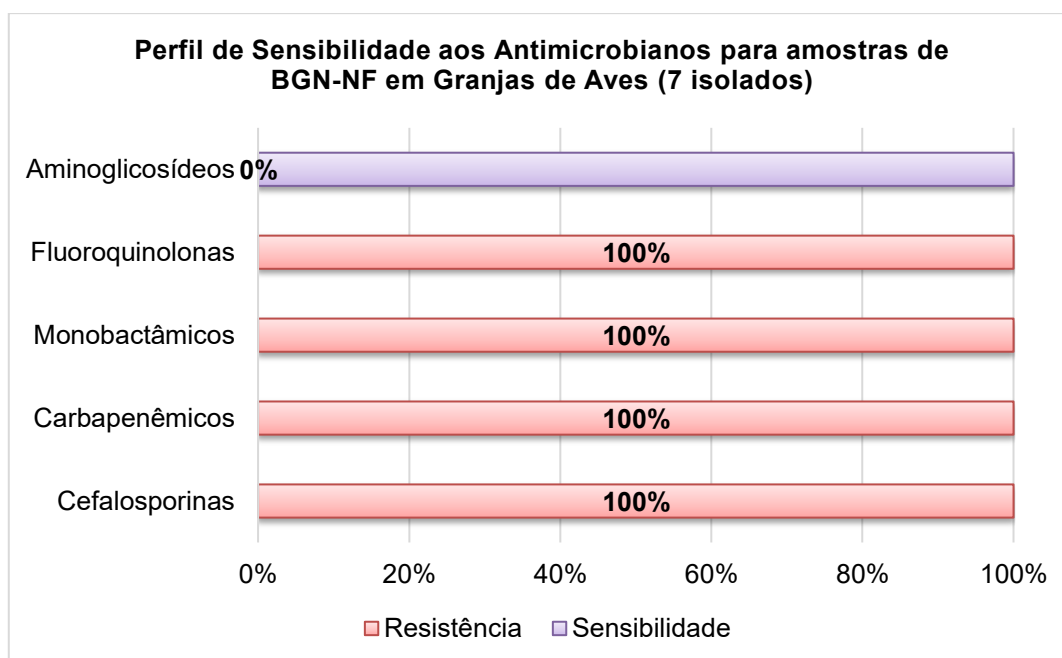
Os resultados apresentados na Figura 43 são representativos de todas as amostras de BGN-NF, as quais foram obtidas apenas de amostras de granjas de suínos, aves e orgânicos. Assim, ressalta-se que para essas amostras foram identificados microrganismos que apresentam resistência intrínseca aos antimicrobianos testados, sendo eles: *Acinetobacter* sp., e *Stenotrophomonas maltophilia*. Portanto, favorecendo a resistência apresentada para à classe das Cefalosporinas, Carbapenêmicos e Fluoroquinolonas. Destaca-se ainda que a

resistência encontrada, principalmente para a classe de Fluoroquinolonas, retrata a antibioticoterapia utilizada nas aves presentes nessas granjas (Enrofloxacina e Danofloxacina®).

Os maiores percentuais de resistência foram para as classes das fluoroquinolonas, monobactâmicos, carbapenêmicos e cefalosporinas, sendo possível caracterizar estas amostras como MDR (*MultiDrug-Resistant*), ou seja, os isolados apresentam resistência a um agente antimicrobiano em 3 ou mais classes distintas de antimicrobianos, segundo a classificação proposta por Magiorakos e colaboradores (2012).

Para as amostras de BNG-NF de granjas de aves, os isolados apresentaram resistência às seguintes classes de antimicrobianos: 100% às Cefalosporinas, 100% aos Carbapenêmicos, 100% aos Monobactâmicos e 100% às Fluoroquinolonas. Não foi encontrada resistência para a classe dos Aminoglicosídeos (Figura 44).

Figura 44. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para amostras de BGN-NF em Granjas de aves.



Fonte: autora.

Os resultados obtidos são esperados devido à farmacoterapia vigente para o tratamento dos animais. Assim, considera-se preocupante o uso desses fármacos para animais de criação para consumo alimentar.

Evidencia-se que os resultados se apresentam de forma discrepante em relação aos outros dados descritos, devido ao menor número de antimicrobianos que são testados para essa espécie (*Pseudomonas* spp.)

Para as amostras BGN-NF de granjas de suínos, os isolados apresentaram resistência às seguintes classes de antimicrobianos: 100% às Fluoroquinolonas e Agente Diversos (Sulfametoxazol + Trimetoprim). Não foi encontrada resistência para à classe dos Aminoglicosídeos, Monobactâmicos e Carbapenêmicos.

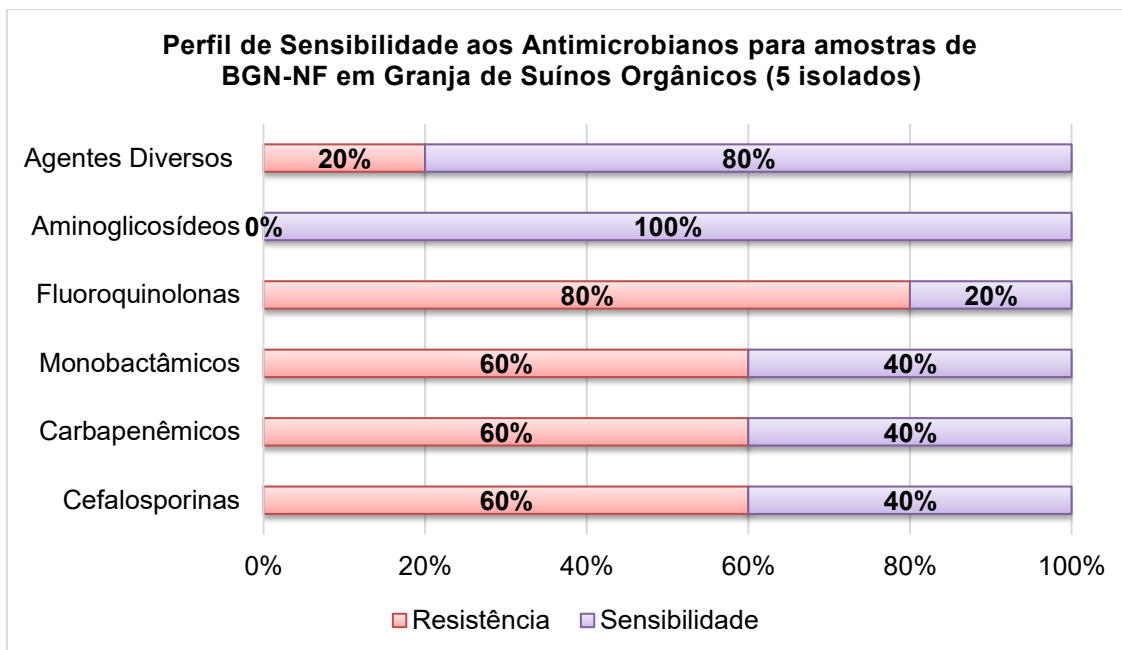
Esses dados foram obtidos de uma única amostra de *Acinetobacter* sp., o qual apresenta uma tabela de leitura de halos no TSA específica, assim, justificando os valores discrepantes em relação aos dados citados anteriormente.

Sabe-se que a espécie *Acinetobacter* sp. apresenta mecanismos de resistência aos antimicrobianos, os quais estão envolvidos na produção de β -Lactamases, especialmente do tipo OXA (EVANS; AMYES, 2014). Portanto, os resultados são compatíveis com os dados da literatura científica, pois as resistências encontradas são demonstradas em outro estudo descrito por Evans e colaboradores (2014).

Por último, as amostras de BGN-NF de granjas de suínos orgânicos apresentaram resistência às seguintes classes de antimicrobianos: 60% às Cefalosporinas, 60% aos Monobactâmicos, 80% às Fluoroquinolonas e 20% para os Agentes Diversos (Sulfametoxazol + Trimetoprim), segundo descrito pelo BrCAST. Não foi encontrada resistência à classe dos Aminoglicosídeos.

As resistências são referentes aos 4 microrganismos encontrados para esses tipo de amostra (*Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas monteilii*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Pseudomonas guariconensis*) (Figura 45).

Figura 45. Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos para amostras de BGN-NF em granjas de suínos orgânicos.



Fonte: autora.

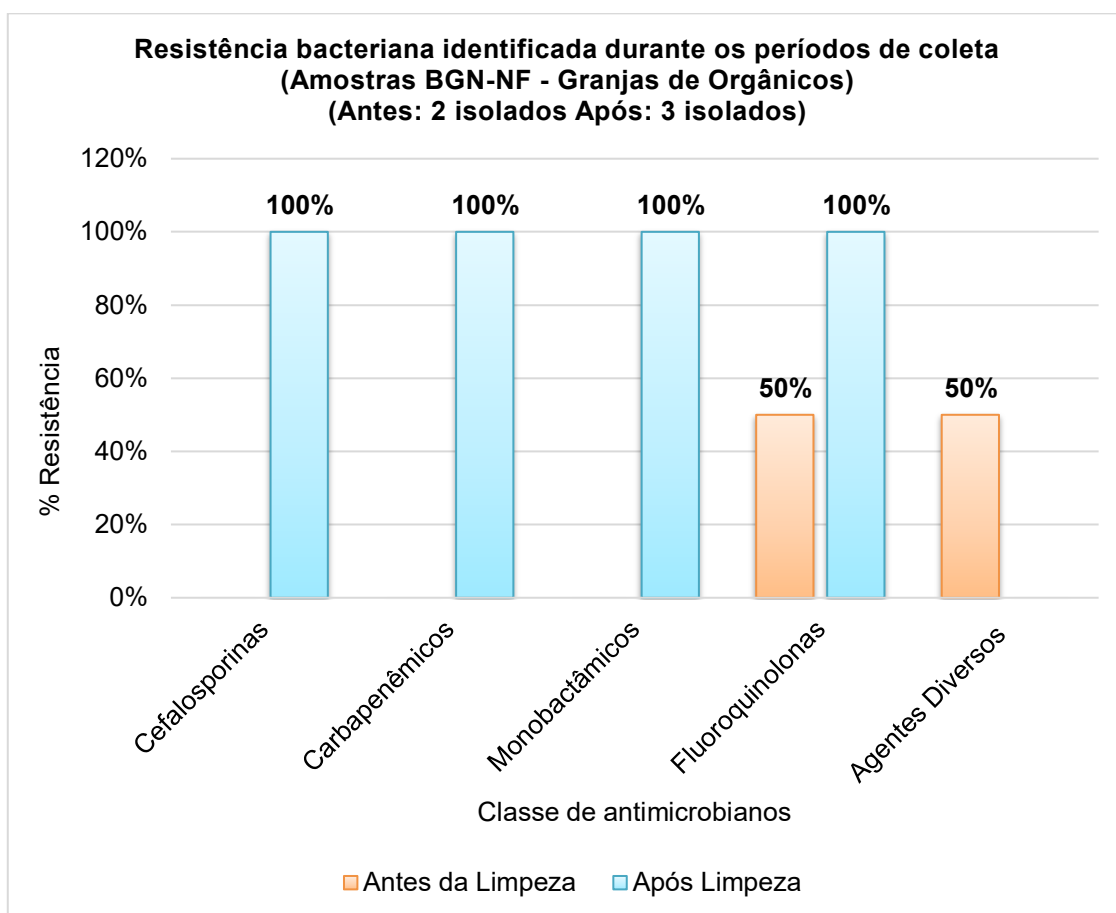
Sabe-se que a espécie *Pseudomonas* spp. apresenta mecanismo de resistência aos antimicrobianos, por meio da produção de β -lactamases, através dos genes *OXA*, *bla*TEM, *bla*VEB e *bla*PER. Em um estudo realizado em carne de camelos, no Egito, foi observada a presença de *Pseudomonas* spp. com resistência, principalmente, à classe das Fluoroquinolonas (OSMAN *et al.*, 2019). Assim, esse estudo apresenta semelhança com os resultados encontrados no presente trabalho, mesmo se tratando de animais diferentes.

Foi possível determinar a resistência bacteriana presente nos dois períodos de coletas realizados para essas amostras. Assim, possibilitando compreender a atuação das resistências bacterianas, diante a utilização de técnicas de desinfecção nos locais de abrigo dos animais.

Para os 2 isolados BGN-NF obtidos no período antes da limpeza, foi observado resistência apenas para à classe das Fluoroquinolonas e Agentes Diversos(Sulfametoxazol + Trimetoprim).

Para os 3 isolados obtidos no período após limpeza, observou-se resistência de 100% para à classe das Cefalosporinas, Carbapenêmicos, Monobactâmicos e Fluoroquinolonas. Assim, destacando-se novamente a importância de uma limpeza eficaz dos locais de abrigo desses animais. Os dados descritos, são ilustrados na Figura 46.

Figura 46. Resistência bacteriana identificada em isolados de BGN-NF obtidos durante os períodos de coleta das amostras de granjas de suínos orgânicos.



Fonte:autora.

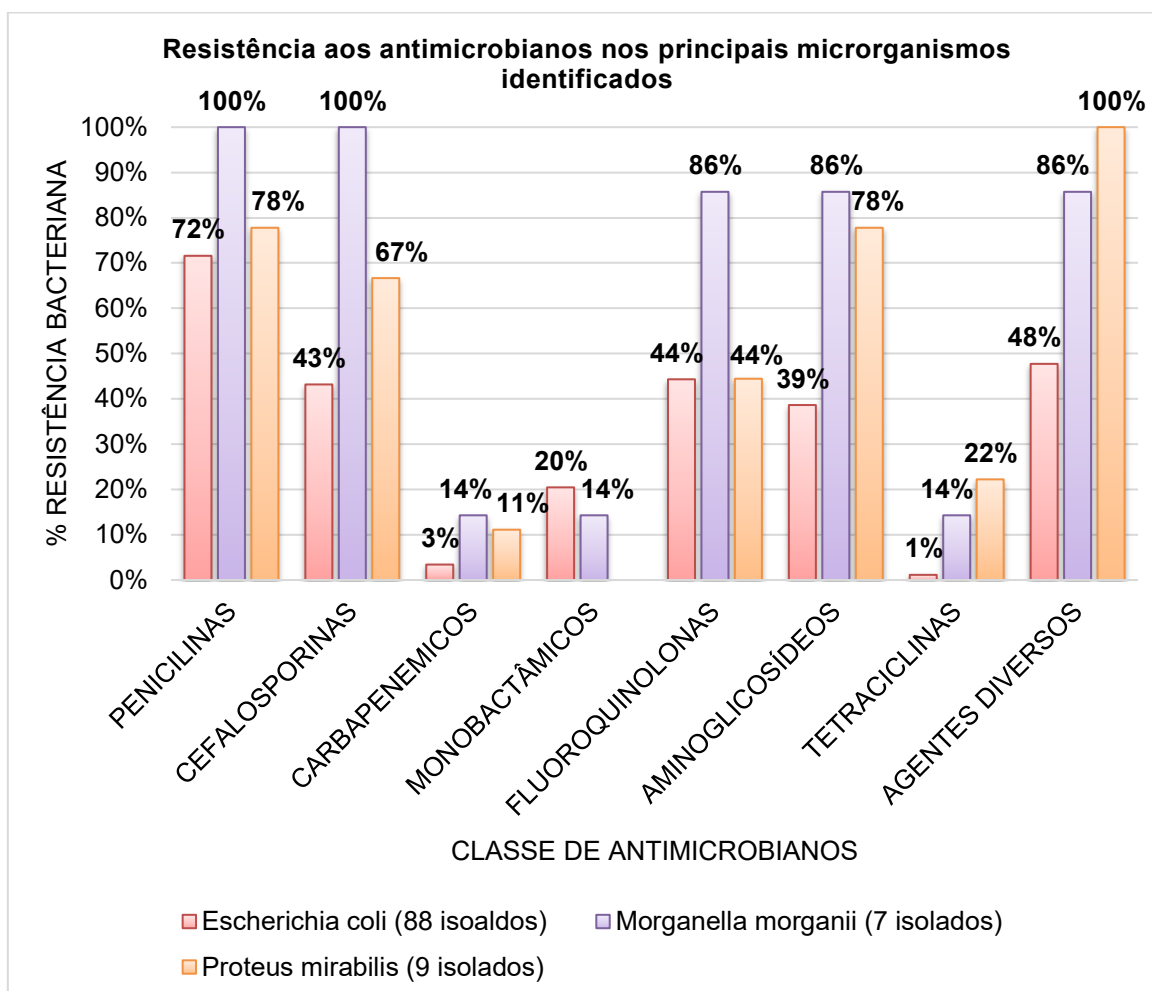
Para melhor compreensão dos dados gerais obtidos, o **APÊNDICE E** representa as resistências encontradas para cada classe de antimicrobiano, conforme o microrganismo identificado, assim, baseando-se na tabela de ponto de corte específica para estes, segundo preconizado pelo BrCAST.

5.4.3 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos identificados

5.4.3.1 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos da ordem *Enterobacterales*

Para os 152 isolados da ordem *Entecobaterales*, destaca-se a predominância de isolados de *Escherichia coli*, *Morganella morganii* e *Proteus mirabilis*, nos quais foram identificados as seguintes resistências: *Escherichia coli* apresentou resistência de 72% à classe das Penicilinas, 43% às Cefalosporinas, 3% aos Carbapenêmicos, 20% aos Monobactâmicos, 44% às Fluoroquinolonas, 39% aos Aminoglicosídeos, 1% às Tetraciclinas e 48% aos Agentes Diversos (Fosfomicina, Nitrofurantoína e Sulfametoxazol+Trimetropim). A *Morganella morganii* apresentou resistência de 100% à classe das Penicilinas, 100% às Cefalosporinas, 14% aos Carbapenêmicos, 14% aos Monobactâmicos, 86% às Fluoroquinolonas, 86% aos Aminoglicosídeos, 14% às Tetraciclinas e 86% aos Agentes Diversos (Fosfomicina, Nitrofurantoína e Sulfametoxazol+Trimetropim). E por fim, o *Proteus mirabilis* apresentou resistência de 78% à classe das Penicilinas, 67% às Cefalosporinas, 11% aos Carbapenêmicos, 44% às Fluoroquinolonas, 78% aos Aminoglicosídeos, 22% às Tetraciclinas e 100% aos Agentes Diversos (Fosfomicina, Nitrofurantoína e Sulfametoxazol+Trimetropim)(Figura 47).

Figura 47. Resistência aos antimicrobianos dos principais microrganismos identificados.



Fonte: autora.

Os resultados apresentados na Figura 47 são semelhantes aos descritos na literatura científica. Allocati e colaboradores (2013) apresentaram uma revisão sobre os estudos de resistência bacteriana em isolados de *Escherichia coli* na Europa, onde observou-se a presença predominante de resistência bacteriana para às clases das Penicilinas, Aminoglicosídeos e Fluroquinolonas em diversos estudos realizados no continente Europeu (Suécia, Noruega, Finlândia, Bulgária, Eslováquia e Chipre) (ALLOCATI *et al.*, 2013).

Em um estudo realizado por Park e colaboradores (2020), no qual foi analisada a resistência aos antimicrobianos de isolados de *Morganella morganii* em amostras de golfinhos em cativeiro na Coreia do Sul, foi observada resistência predominante às classes das penicilinas e cefalosporinas (PARK *et al.*, 2020). Sendo assim, os resultados dos estudos disponíveis na literatura são

compatíveis com os encontrados no presente trabalho, apesar das diferenças entre as amostras analisadas.

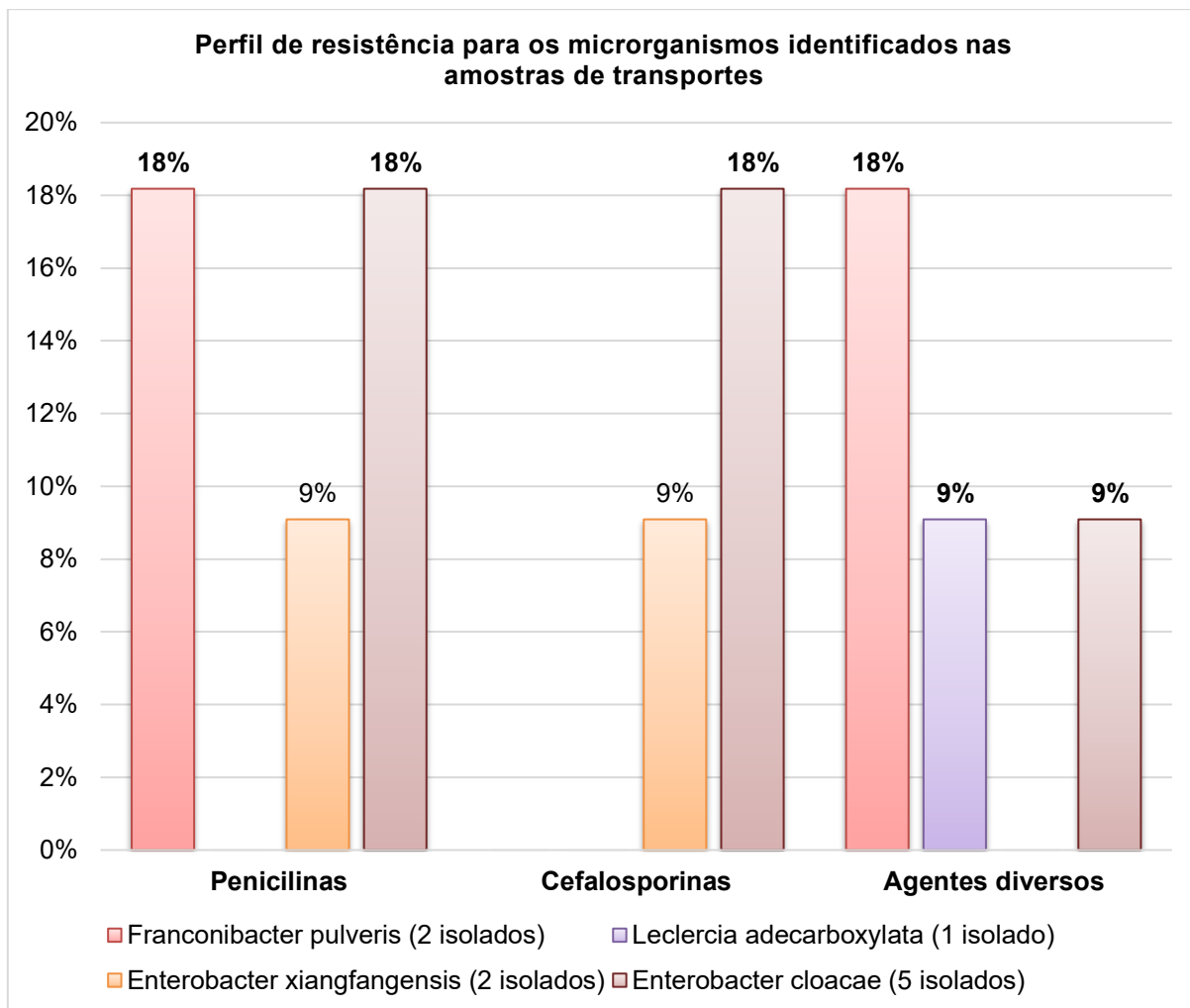
E um estudo realizado com isolados de *Proteus mirabilis* obtidos de amostras de pacientes, também foram observados resultados semelhantes aos do presente trabalho, diferenciando-se apenas da resistência bacteriana encontrada para a classe dos carbapenêmicos, na qual os autores destacam uma resistência considerável à esta classe de antimicrobianos nas amostras clínicas (BOUDJEMAA *et al.*, 2019).

A seguir os resultados são apresentados de forma separada para maior compreensão do perfil de resistência dos microrganismos obtidos para cada amostra.

Para as amostras de transportes identificou-se que 18% dos isolados de *Franconibacter pulveris* foram resistentes a classe das Penicilinas e 18% à classe dos agentes diversos (Sulfametoxazol + Trimetoprim). Já para os isolados de *Leclercia adecarboxylata*, 9% deles foram resistentes a classe dos agentes diversos (Sulfametoxazol + Trimetoprim).

Os isolados de *Enterobacter xiangfangensis*, 9% deles foram resistentes a classe das Penicilinas e 9% à classe das Cefalosporinas. Por sua vez, entre os isolados de *Enterobacter cloacae*, 18% deles foram resistentes à classe das Penicilinas, 18% à classe das Cefalosporinas e 9% à classe dos agentes diversos (Sulfametoxazol + Trimetoprim), conforme o Figura 48.

Figura 48. Perfil de resistência para os microrganismos identificados nas amostras de transportes.



Para as amostras de granjas de suínos orgânicos, os dados referentes aos microrganismos identificados e ao perfil de resistência encontrado nas amostras estão dispostos na Tabela 4. Salienta-se que para as amostras que não apresentaram identificação, o TSA foi realizado à partir da tabela de ponto de corte clínico para *Enterobacterales*, portanto, mesmo sem o microrganismo identificado é possível observar o seu perfil de resistência aos antimicrobianos.

Já os resultados obtidos para as amostras de pacientes são descritos na Tabela 5.

Tabela 4. Perfil de resistência para os microrganismos identificados nas amostras de granjas de suínos orgânicos.

Microrganismos	Classes de antimicrobianos							
	Penicilinas	Cefalosporinas	Carbapenêmicos	Monobactâmicos	Fluoroquinolonas	Aminoglicosídeos	Tetraciclina	Agentes diversos
<i>Escherichia coli</i>	43%	20%	2%	6%	26%	17%	0%	17%
<i>Morganella morganii</i>	7%	7%	0%	0%	7%	7%	2%	7%
<i>Proteus penneri</i>	2%	2%	0%	0%	0%	2%	0%	2%
<i>Proteus mirabilis</i>	6%	6%	2%	0%	6%	6%	4%	7%
<i>Proteus hauseri</i>	11%	11%	2%	0%	6%	7%	0%	11%
<i>Proteus vulgaris</i>	2%	4%	0%	0%	0%	0%	0%	4%
<i>Citrobacter braakii</i>	0%	2%	0%	0%	4%	0%	0%	0%
Sem identificação	4%	4%	4%	2%	4%	2%	0%	4%
<i>Providencia rettgeri</i>	2%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	2%
<i>Acinetobacter gernerii</i>	0%	2%	0%	2%	2%	2%	0%	2%

Fonte: autora.

Tabela 5. Perfil de resistência para os microrganismos identificados nas amostras de pacientes.

Microrganismos	Classes de antimicrobianos							
	Penicilinas	Cefalosporinas	Carbapenêmicos	Monobactâmicos	Fluoroquinolonas	Aminoglicosídeos	Tetraciclina	Agente diversos
<i>Escherichia coli</i>	40%	26%	3%	16%	22%	22%	1%	30%
<i>Morganella morganii</i>	3%	3%	1%	1%	1%	1%	0%	1%
<i>Proteus mirabilis</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Citrobacter braakii</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Citrobacter sedlakii</i>	0%	3%	0%	0%	3%	0%	0%	0%
<i>Klebsiella aerogenes</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Providencia stuartii</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Hafnia alvei</i>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Enterobacter cloacae</i>	1%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%

Fonte: autora

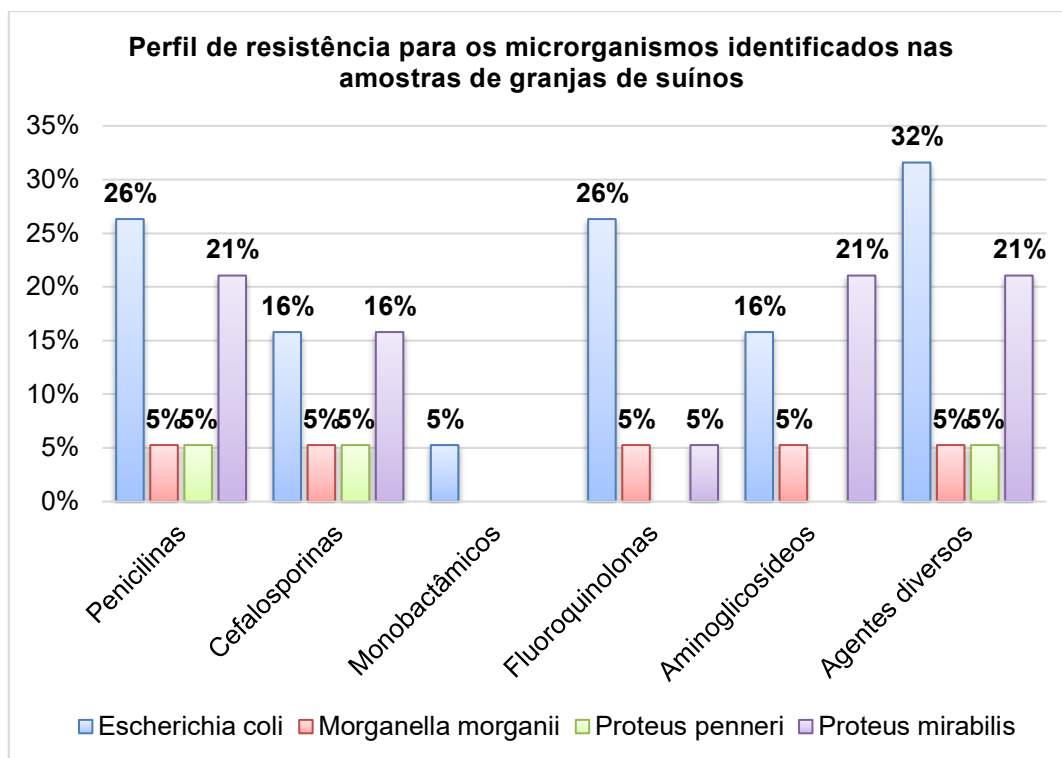
Para os isolados de granjas de suínos identificou-se que 26% de *Escherichia coli* foram resistentes à classe das Penicilinas, 16% à classe das Cefalosporinas, 5% à classe dos Monobactâmicos, 26% à classe das Fluoroquinolonas, 16% à classe dos aminoglicosídeos e 32% à classe dos agentes diversos (Sulfametoxazol + Trimetoprim).

Nos isolados de *Morganella morganii*, 5% deles foram resistentes à classe das Penicilinas, 5% à classe das Cefalosporinas, 5% à classe das Fluoroquinolonas, 5% à classe dos aminoglicosídeos e 5% à classe dos agentes diversos (Sulfametoxazol + Trimetoprim).

Já para os isolados de *Proteus penneri*, 5% deles foram resistentes à classe das Penicilinas, 5% à classe das Cefalosporinas e 5% à classe dos agentes diversos (Sulfametoxazol + Trimetoprim).

E por fim, nos isolados de *Proteus mirabilis*, 21% deles foram resistentes à classe das Penicilinas, 16% à classe das Cefalosporinas, 5% à classe das Fluoroquinolonas, 21% à classe dos aminoglicosídeos e 21% à classe dos agentes diversos (Sulfametoxazol + Trimetoprim), conforme ilustrado na Figura 49.

Figura 49. Perfil de resistência para os microrganismos identificados nas amostras de granjas de suínos.



Fonte: autora.

Nas amostras de granjas de aves identificou-se que 33% dos isolados de *Escherichia coli* foram resistentes à classe das penicilinas, 33% à classe das Cefalosporinas, 17% à classe dos Monobactâmicos, 25% à classe das Fluoroquinolonas, 42% à classe dos Aminoglicosídeos e 32% à classe dos agentes diversos (Sulfametoxazol + Trimetoprim).

Portanto, a partir dos dados expostos é possível observar que maioria dos resultados são compatíveis com a literatura científica apresentada no tópico de revisão bibliográfica. Pois, como descrito por Roth e colaboradores (2019) em seu trabalho, há uma predominância de isolados de *Escherichia coli* e, que os mesmo apresentam resistência predominante às classes das Penicilinas, Cefalosporinas.

Outro resultado compatível com a literatura, foi presença de resistência à Sulfametoxazol + Trimetoprim nas amostras de granjas de aves, o qual é também descrito por Windleyanne e colaboradores (2016).

A presença de *Escherichia coli* em amostras de granjas de suínos também é considerado um resultado presente na literatura, pois segundo Abubakar e

colaboradores (2019) são considerados microrganismos relevantes devido à possível causa de diarreia nesses animais.

No presente trabalho não foi possível obter os dados do estado clínico desses animais, por isso não foi possível determinar que a presença de *Escherichia coli* nessas amostras possa ter causada uma possível diarreia nesses animais. E, também não foi possível saber a antibioticoterapia vigente para o tratamento no momento de coleta dessas amostras.

5.4.3.2 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos não fermentadores da glicose

Para as amostras de Bacilos Gram-negativos Não fermentadores da glicose observou-se que para os isolados de *Pseudomonas monteilii*, 89% foram resistentes à classe das Cefalosporinas, 89% à Classe dos Carbapenêmicos, 89% à dos Monobactâmicos e 100% à Classe das Fluoroquinolonas.

Para os isolados de *Pseudomonas guariconensis*, 100% foram resistentes à classe das Cefalosporinas, 100% à Classe dos Carbapenêmicos, 100% à dos Monobactâmicos e 100% à Classe das Fluoroquinolonas.

Já, para os isolados de *Pseudomonas brassicacearum*, 100% foram resistentes à classe das Cefalosporinas, 100% à Classe dos Carbapenêmicos, 100% à dos Monobactâmicos e 100% à Classe das Fluoroquinolonas.

Nos isolados de *Stenotrophomonas maltophilia* foi observada 100% de resistência à classe dos Agentes diversos, a qual é representada pelo antimicrobiano Sulfametoxazol +Trimetoprim.

E por fim, para os isolados de *Acinetobacter* sp. foi observada 100% de resistência à classe dos Agentes diversos, a qual é representada pelo antimicrobiano Sulfametoxazol +Trimetoprim e, 100% de resistência à classe das Fluoroquinolonas (Quadro 9).

Quadro 9. Resistência aos antimicrobianos nos microrganismos identificados nas amostras não fermentadoras da glicose.

Microrganismos	Classes de antimicrobianos				
	Cefalosporinas	Carbapenêmicos	Monobactâmicos	Fluoroquinolonas	Agentes Diversos
<i>Pseudomonas monteilii</i>	89%	89%	89%	100%	0%
<i>Pseudomonas guariconensis</i>	100%	100%	100%	100%	0%
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	100%	100%	100%	100%	0%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0%	0%	0%	0%	100%
<i>Acinetobacter sp.</i>	0%	0%	0%	100%	100%

Fonte: autora.

Todos os bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose obtidos, foram isolados de amostras de granjas (aves, suínos e de suínos orgânicos), caracterizando a diversidade presente nesses ambientes de coleta, devido a inexistência desses microrganismos em amostras de pacientes e transportes.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que o perfil de resistência encontrado para as amostras das diferentes espécies de *Pseudomonas spp.* se apresentaram semelhantes e, que tais perfis encontrados são compatíveis com a literatura científica. Onde Radovanovic e colaboradores (2020) descrevem as resistência aos antimicrobianos em isolados de *Pseudomonas spp.* obtidos em amostras clínicas e em alimentos de origem animal. Apesar da diferença das amostras e pela não identificação de *Pseudomonas spp.* em amostras de pacientes no presente estudo, os perfis de resistência encontrado no trabalho de Radovanovic e colaboradores (2020) e no presente estudo são semelhantes e, possibilitam caracterizar o comportamento dessa espécie frente aos tratamentos com antimicrobianos nos diferentes meios.

Outro ponto relevante sobre tais amostras é a capacidade de formação de biofilme por esses microrganismos (*Pseudomonas spp.* e *Stenotrophomonas maltophilia*), o que pode justificar a presença predominante desses microrganismos em amostras de granjas, as quais são propícias a apresentar essa formação de biofilme, devido à ineficaz limpeza realizada nesses ambientes.

5.5 Identificação de resistência aos carbapenêmicos

5.5.1 Teste Blue-Carba

Afim de detectar colônias resistentes aos carbapenêmicos, por meio da identificação da presença da enzima carbapenemase, inicialmente foi realizado o teste de detecção rápida de carbapenemases direto de placas de cultivo através o kit Blue-Carba.

Para o teste foram utilizadas apenas colônias que apresentaram resistência à algum antimicrobiano da classe dos carbapenêmicos testados no TSA. Assim, 31 amostras das 173 testadas, apresentaram resistência e foram analisadas com o Kit Blue-Carba.

Das 31 amostras, 7 correspondem às amostras de pacientes (paciente 2: 3 colônias; paciente 3: 1 colônia; paciente 10: 2 colônias), 14 amostras correspondentes às amostras de granjas de suínos orgânicos (antes da limpeza: 7 colônias; após limpeza: 10 colônias) e por fim, 7 colônias correspondentes às amostras de granjas de aves.

Destaca-se que 67,7% das amostras apresentaram resistência ao antimicrobiano Ertapenem, sendo esse considerado o principal fármaco utilizado na clínica, dentre à classe dos carbapênêmicos, assim, elucidando à influência direta da farmacoterapia e o surgimento resistências bacterianas.

De todas as amostras testadas, apenas 3 foram positivas para carbapenemases, sendo nessas amostras identificado através da técnica PCR, o gene *blaKPC*, uma carbapenemase de classe A, de extrema relevância clínica.

Todas as amostras positivas no teste Blue-Carba correspondem ao paciente 2, o qual no Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA), apresentou resistência às diferentes classes de antimicrobianos, incluindo todos os carbapenêmicos testados, assim, confirmando os resultados encontrados na técnica de PCR, a qual identificou os genes *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M1* e *blaKPC*, representando uma ampla resistência antimicrobiana.

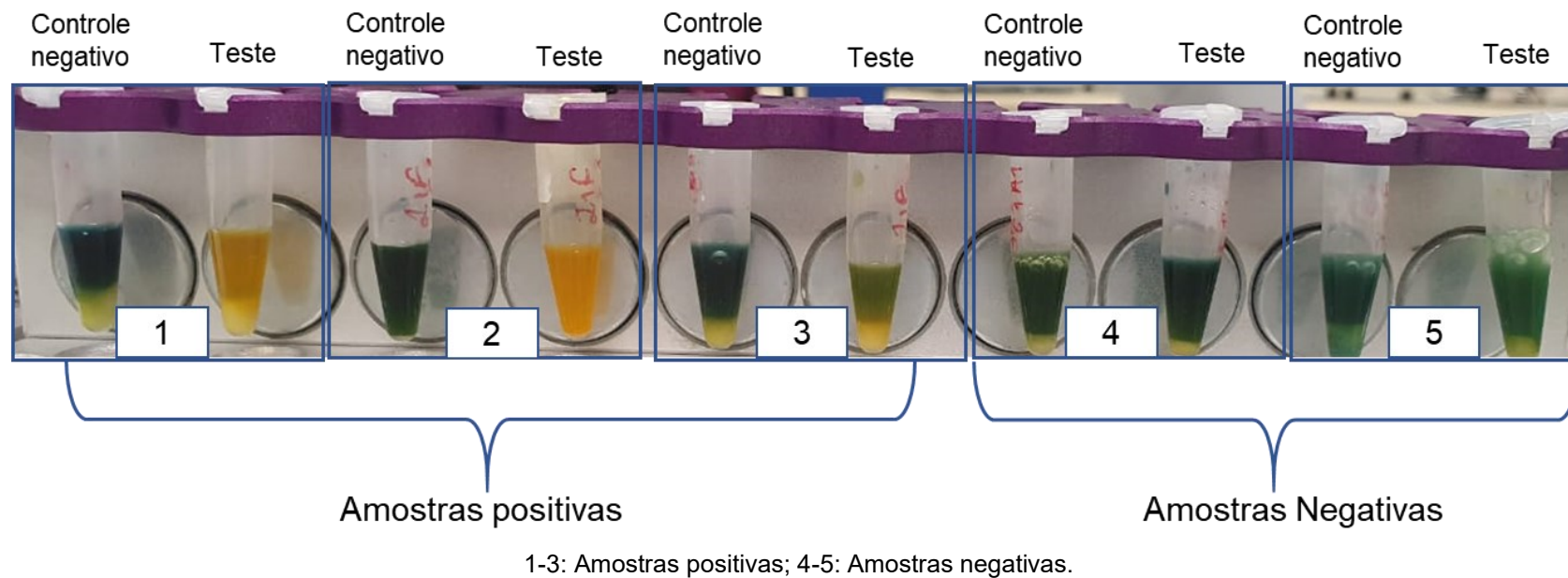
Destaca-se a necessidade da realização de diferentes metodologias para a identificação de resistência bacteriana, já que *Enterobacteriales* produtoras de

carbapenemases (CPE) constituem um problema crítico de saúde pública e médica (TENOVER *et al.*, 2013).

Por fim, a rápida identificação desses isolados que colonizam ou infectam pacientes é crucial para melhorar as medidas de controle de infecção com antibioticoterapia adequada e para minimizar a disseminação desses microrganismos resistentes (NORDMANN; POIREL, 2014).

Na Figura 50 são dispostas as amostras positivas e negativas encontradas e, o Quadro 10 apresenta os resultados encontrados com o Kit Blue-Carba para essas amostras.

Figura 50. Foto representativa das amostras positivas e negativas obtidas com o Kit Blue-Carba.



Fonte: autora.

Quadro 10. Resultados obtidos para as amostras com resistência aos carbapenêmicos.

Amostra	Espécie	Origem	Genes de resistência identificados	Resistência aos carbapenêmicos	Cor Controle/Teste -Blue Carba	Resultado Blue-Carba
GAI1C1A1	Pseudomonas monteillii	Granja aves	Não identificado	Ertapenem	verde/verde	Negativo
GAI1C1B1		Granja aves	TEM, CTX-M 2	Meropenem	verde/verde	Negativo
GAI3C1A1	Pseudomonas monteillii	Granja aves	Não identificado	Meropenem	verde/verde	Negativo
GAI2C1B1		Granja aves	CTX-M 1	Meropenem	verde/verde	Negativo
GAI2C1A1		Granja aves	Não identificado	Meropenem	verde/verde	Negativo
GAI3C1B1		Granja aves	TEM	Meropenem	verde/verde	Negativo
GAI3C1B1		Granja aves	CTX-M 1	Meropenem	verde/verde	Negativo
SGO2.2A1	Pseudomonas chlororaphis	Granja de orgânicos (após limpeza)	Não identificado	Meropenem	verde/verde	Negativo
SGO2.2B1	Pseudomonas brassicacearum	Granja de orgânicos (após limpeza)	KPC	Meropenem	verde/verde	Negativo
SGO 2.1 A2	Pseudomonas monteillii	Granja de orgânicos (antes da limpeza)	TEM, CTX-M 1	Ertapenem	verde/verde	Negativo
SGO 2.2 A1		Granja de orgânicos (após limpeza)	Não identificado	Ertapenem e Meropenem	verde/verde	Negativo
SGO 3.1 A	Pseudomonas monteillii	Granja de orgânicos (antes da limpeza)	TEM, CTX-M 1	Ertapenem e Meropenem	verde/verde	Negativo
SGO 3.2 B		Granja de orgânicos (após limpeza)	Não identificado	Ertapenem e Meropenem	verde/verde	Negativo

SGO 4.2 C2	Sem identificação	Granja de orgânicos (após limpeza)	TEM	Imipenem	verde/verde	Negativo
SGO 5.1 A1	Pseudomonas chlororaphis	Granja de orgânicos (antes da limpeza)	TEM	Ertapenem	verde/verde	Negativo
SGO 5.1 A2		Granja de orgânicos (antes da limpeza)	TEM	Ertapenem	verde/verde	Negativo
SGO 5.1 B1	Escherichia coli	Granja de orgânicos (antes da limpeza)	Não identificado	Ertapenem e Meropenem	verde/verde	Negativo
SGO 5.1 B2		Granja de orgânicos (antes da limpeza)	Não identificado	Ertapenem	verde/verde	Negativo
SGO 5.1 C1	Sem identificação	Granja de orgânicos (antes da limpeza)	Não identificado	Ertapenem	verde/verde	Negativo
SGO5.2A1	Pseudomonas guariconensis	Granja de orgânicos (após limpeza)	KPC	Meropenem	verde/verde	Negativo
SGO 5.2 A2	Proteus mirabilis	Granja de orgânicos (após limpeza)	Não identificado	Ertapenem	verde/verde	Negativo
SGO 5.2 B1		Granja de orgânicos (após limpeza)	Não identificado	Ertapenem	verde/verde	Negativo
SGO 5.2 B2	Escherichia coli	Granja de orgânicos (após limpeza)	CTX-M 1	Ertapenem	verde/verde	Negativo

SGO 5.2 C1	Escherichia coli	Granja de orgânicos (após limpeza)	Não identificado	Ertapenem	verde/verde	Negativo
2 IFA2.2	Escherichia coli	Amostra fezes paciente internado	TEM, CTX- M1, KPC	Ertapenem, Imipenem e Meropenem	azul/amarelo	Positivo
2 IFB1		Amostra fezes paciente internado	TEM, SHV, CTX-M 1, 9, KPC	Ertapenem e Meropenem	azul/verde-amarelado	Positivo
2 IFC1	Proteus hauseri	Amostra fezes paciente internado	TEM, SHV, CTX-M 1, 9, KPC	Ertapenem, Imipenem e Meropenem	verde/amarelo	Positivo
3 IFA1		Amostra fezes paciente internado	Não identificado	Ertapenem, Imipenem e Meropenem	ver/verde	Negativo
10 IFA2	Escherichia coli	Amostra fezes paciente internado	Não identificado	Ertapenem	ver/verde	Negativo
10 IFC1	Proteus hauseri	Amostra fezes paciente internado	Não identificado	Ertapenem	ver/verde	Negativo
10 ALB2		Amostra leite paciente alta	TEM	Ertapenem	ver/verde	Negativo

Fonte: autora.

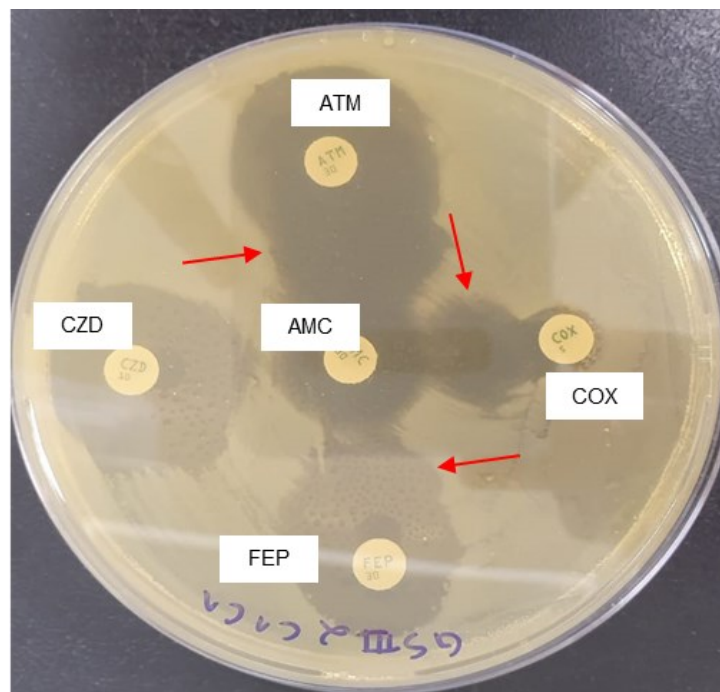
Legenda: SGO: Granjas de Suínos Orgânicos. IF: Amostra de fezes de paciente no período de internação. IFA: Amostra de fezes de paciente no período de alta. AL: Amostra de leite de paciente no período de alta. GA: Granjas de Aves.

5.5.2 Identificação fenotípica para ESBL

A identificação fenotípica para ESBL foi realizada durante o Teste de Sensibilidade ao Antimicrobianos (TSA), no qual foram preparadas placas de Muller Hinton inoculadas com a solução obtida de cada isolado dispostos sobre o agar os discos com os antimicrobianos específicos e observado a formação de um halo fantasmas entre os discos (setas vermelhas), conforme demonstrado na Figura 51.

A sensibilidade da detecção de ESBL varia com o antimicrobiano, a qual depende da afinidade da ESBL pelo substrato presente no fármaco (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). Por exemplo, a ESBL *bla*CTX-M tem maior afinidade pelo Cefotaxima (MATSUMOTO *et al.*, 1988). Ressalta-se que o Teste de Disco Aproximação não é um teste fenotípico confirmatório para detecção de ESBL, sendo necessária a utilização de metodologias mais específicas para possível confirmação.

Figura 51. Teste positivo para ESBL, através do Teste de Disco aproximação.



ATM: Aztreonam 30µg; COX: Cefotaxima 5µg; FEP: Cefepima 30µg; CZD: Ceftazidima 10 µg; AMC: Amoxicilina+ Ácido Clavulânico 20/10 µg. Fonte:autora.

Neste estudo, a detecção de ESBL pelo aparecimento da distorção no halo de inibição ou da zona fantasma, foi positivo em 14% das amostras para Cefotaxima, 52% para Aztreonam, 36% para Ceftazidima e 68% para Cefepima. Em 24% das amostras, ocorreu a distorção no halo de inibição para todos os antimicrobianos testados.

Observou-se 50 isolados de granjas positivos para ESBL, dos quais 23 isolados correspondem à granja de suínos orgânicos, 9 isolados de granjas de suínos, 14 isolados de granjas de aves e, 4 isolados de pacientes foram positivos para ESBL, não sendo observado a presença de ESBL nas amostras de transportes, totalizando 50 amostras positivas para ESBL, ou seja, uma representação de 28,9% das amostras totais. Os dados são ilustrados na Tabela 6.

Tabela 6. Isolados positivos para ESBL.

Local	Número de isolados positivos ESBL
Granjas de suínos orgânicos	23 (antes da limpeza: 9; após limpeza: 14)
Granjas suínos	9
Granjas aves	14
Pacientes	4

Transportes	0
TOTAL	50 (28,9%)

Fonte: autora.

Diante dos resultados obtidos, observa-se o domínio de positividade para ESBL em amostras de granjas de suínos orgânicos nas quais, 14 isolados são de amostras obtidas após limpeza das granjas, assim, reiterando a discussão do tópico 5.1, onde os resultados evidenciam a falta de qualidade dos procedimentos de limpeza realizados no local de abrigo desses animais, os quais apresentam a formação de biofilmes de difícil remoção.

Outro dado relevante, é que uma das amostras de pacientes positiva para ESBL, corresponde à amostra 10IFA2, mesma amostra testada para a identificação de carbapenemase. Essa amostra apresentou resultado negativo tanto para o teste de carbapenemases quanto para o PCR, ou seja, não foi possível identificar uma possível resistência através dessas metodologias, apenas com o teste fenotípico para ESBL. Um resultado que reitera os dados obtidos com o Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos, o qual indicou a presença de resistência aos principais β -lactâmicos testados (Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenêmicos e Monobactâmicos) para tal amostra.

Para maior compreensão das características de cada amostra testada, são apresentadas no Quadro 11 a identificação de cada amostra obtida pelo MALDI-ToF. Desse modo, observa-se uma presença considerável de amostras de *Escherichia coli* positivas para ESBL, representando 41,6% das amostras totais positivas.

O resultado obtido é compatível com a literatura, pois conforme Rupp e colaboradores (2003), constata-se uma porcentagem considerável de amostras positivas para ESBL, embora a prevalência de ESBLs não seja conhecida, ela está claramente aumentando e, em muitas partes do mundo, de 10 a 40% das cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* expressam ESBLs e, salienta-se que a identificação de ESBL em amostras de diferentes ambientes, é justificada pelas taxas crescentes de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade. (WOERTHER; ANDREMONT; KANTELE, 2017).

Quadro 11. Caracterização das amostras positivas para ESBL.

Amostras	Identificação MALDI-TOF	
Amostras Granjas aves	GA I1C1B1	<i>Pseudomonas monteillii</i>
	GAI3C1A1	<i>Pseudomonas monteillii</i>
	GAI11C1A1	<i>Escherichia coli</i>
	GAI11C1C1	<i>Escherichia coli</i>
	GAI13C1A1	<i>Escherichia coli</i>
	GAI13C1A2	<i>Escherichia coli</i>
	GAI13C1B1	<i>Pseudomonas monteillii</i>
	GAI3C1A1	<i>Pseudomonas monteillii</i>
	GAI2C1CA	<i>Pseudomonas monteillii</i>
	GAI13C1D3	<i>Escherichia coli</i>
	GAI3C1B1	<i>Pseudomonas monteillii</i>
	GAI1C1A1	<i>Pseudomonas monteillii</i>
	GAI1C1B1	<i>Pseudomonas monteillii</i>
	GAI2C1B1	<i>Pseudomonas monteillii</i>
Amostras Granjas suínos	GS13C1A1	<i>Alcaligenes faecalis</i>
	GS111C1A1	<i>Acinetobacter sp.</i>
	GS13C1A2	<i>Escherichia coli</i>
	GS112C1A1	<i>Escherichia coli</i>
	GS111C1B1	<i>Proteus penneri</i>
	GS112C1A1	<i>Proteus mirabilis</i>
	GS112C1B1	<i>Proteus mirabilis</i>
	GS112C1C1	<i>Proteus mirabilis</i>
	GS112C1D3	<i>Proteus mirabilis</i>
Amostras Granjas de orgânicos	SGO1.1A1	<i>Proteus mirabilis</i>
	SGO1.1A2	<i>Escherichia coli</i>
	SGO1.1C2	<i>Escherichia coli</i>
	SGO1.2A2	<i>Proteus hauseri</i>
	SGO1.2B3	<i>Proteus hauseri</i>
	SGO1.2C1	<i>Proteus hauseri</i>
	SGO3.2C1	<i>Escherichia coli</i>
	SGO2.1A1	<i>Pseudomonas monteillii</i>
	SGO2.1A2	Sem identificação
	SGO2.2B1	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
	SGO2.2C1	<i>Escherichia coli</i>
	SGO4.2A2	<i>Escherichia coli</i>
	SGO4.2B1	<i>Providencia rettgeri</i>
	SGO5.1A2	<i>Escherichia coli</i>
	SGO5.1C2	<i>Escherichia coli</i>
	SGO5.2B1	<i>Proteus vulgaris</i>
	SGO5.2B2	<i>Proteus vulgaris</i>
	SGO5.2B3	<i>Escherichia coli</i>
	SGO5.2A1	<i>Pseudomonas guariconensis</i>
	SGO1.1B1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
SGO5.2C1	<i>Proteus hauseri</i>	
Amostras pacientes	10IFA2	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	13ARC	<i>Escherichia coli</i>
	10IFB3	<i>Citrobacter braakii</i>
	10IFC3	<i>Citrobacter braakii</i>

Fonte: autora.

Legenda: SGO: Granjas de Suínos Orgânicos. GA: Granjas de Aves. GS: Granjas de Suínos. IF: Amostra de fezes de paciente no período de internação. AR: Amostra de swab retal de paciente no período de alta.

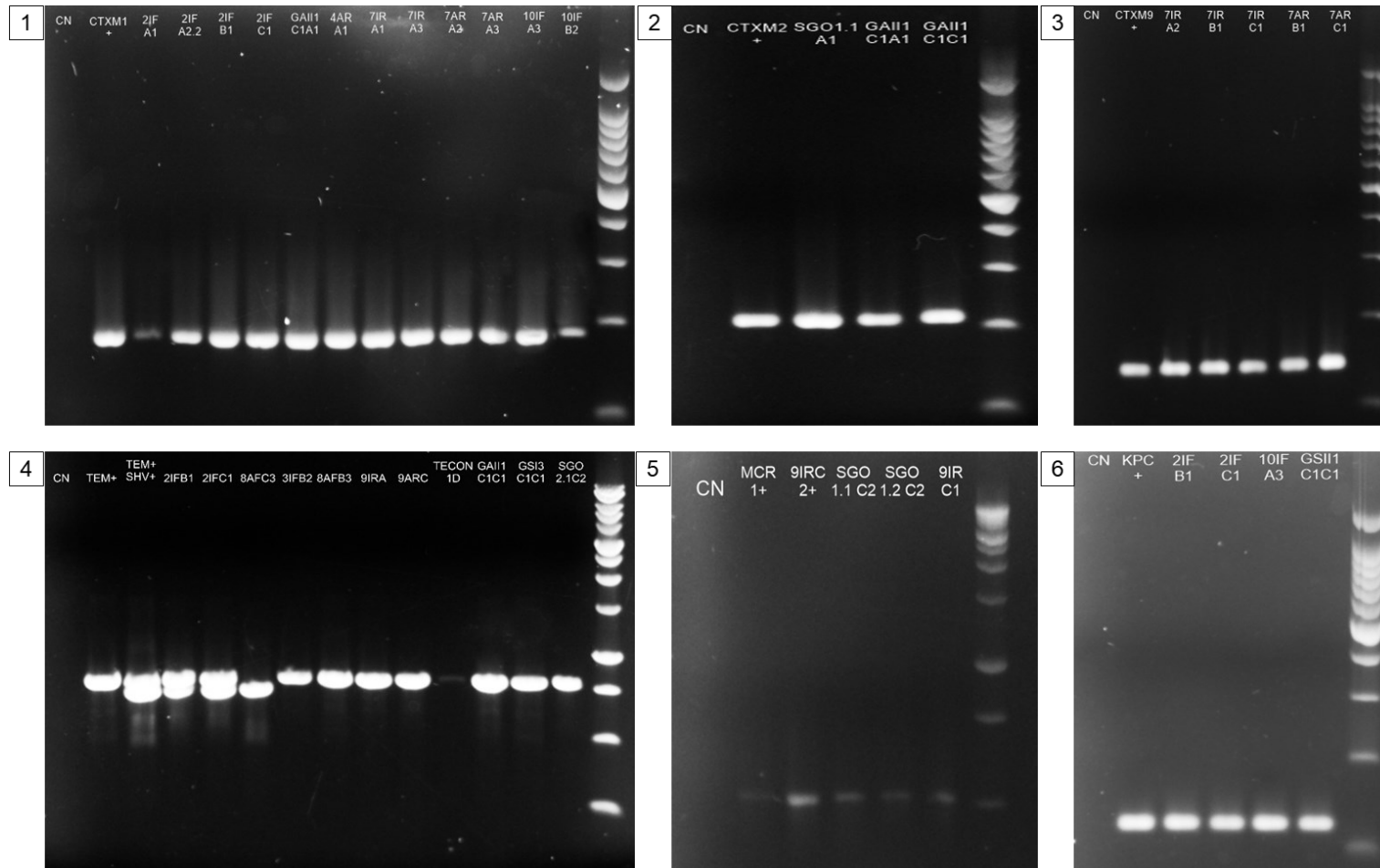
5.6 Amplificação dos genes de resistência

A partir da metodologia de PCR, foi possível realizar a amplificação dos genes de resistência em estudo, para todos os isolados obtidos. As amostras positivas para os genes avaliados são representadas na Figura 52.

Conforme disposto na Figura 53, observou-se a presença do gene *bla*TEM em 3 isolados de transportes, 44 isolados de granjas e 44 isolados de pacientes, caracterizando que 53% das amostras totais apresentaram o gene *bla*TEM. Para, o gene *bla*SHV observou-se a sua presença em 3 isolados de pacientes e, em 1 isolado de granja, não sendo identificado nos isolados de transportes, portanto, representando 2% de presença nas amostras totais. Para os genes *mcr*1-5, foi identificado apenas o gene *mcr* -1 nas amostras obtidas e, observou-se sua presença em 2 isolados de pacientes, em 3 isolados de granjas, não sendo identificado nos isolados de transportes, portanto, representando 3% de presença nas amostras totais. Para os genes *bla*CTX-M 1,2,9 foram obtidos 54 isolados de pacientes positivos, 34 isolados de granjas positivos e 6 isolados de transportes positivos, assim, representando 54% de presença nas amostras totais. Ressalta-se que na Tabela 7, os dados para o gene *bla*CTX-M são representados de forma mais detalhada para cada tipo estudado.

Para o gene *bla*KPC, observou-se a sua presença em 12 isolados de pacientes, em 33 isolados de granjas, não sendo identificado nos isolados de transportes, portanto, representando 27% de presença nas amostras totais. E por fim, para o gene *bla*NDM, não foi identificada sua presença nos isolados obtidos. Os dados descritos a cima são ilustrados nas Figura 53 e Figura 54.

Figura 52. Fotos representativas das amostras positivas para cada gene de resistência.



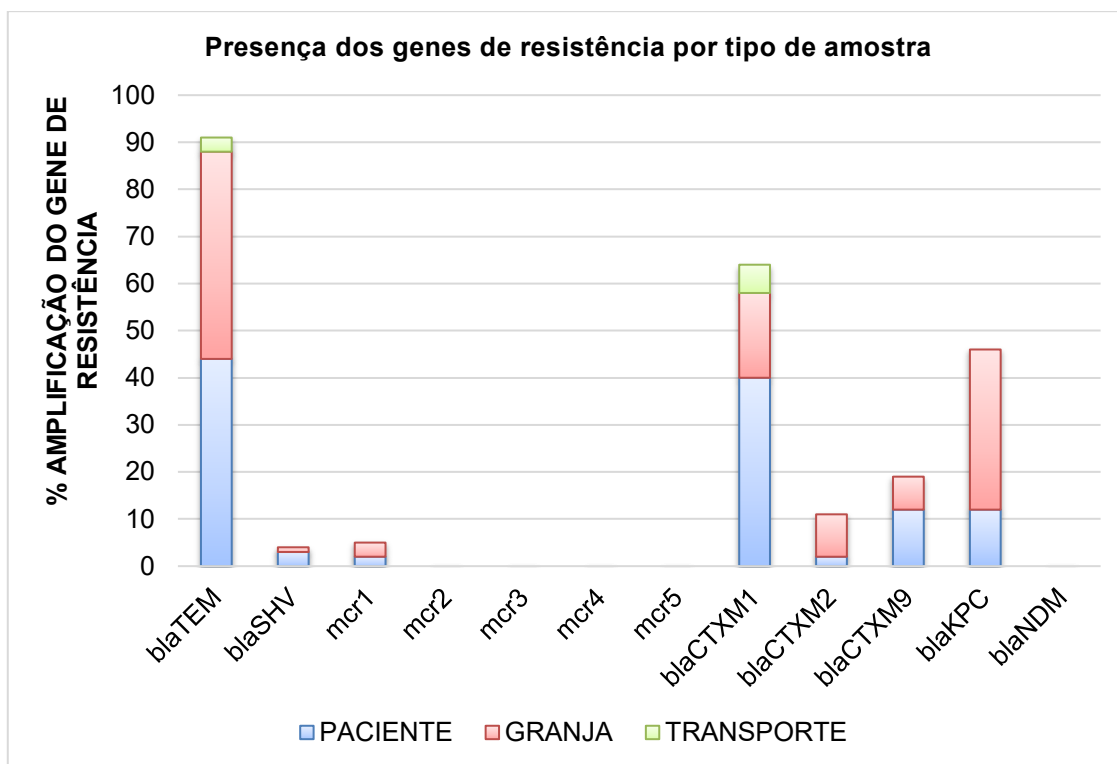
1) Amostras representativas para o gene *bla*CTX-M 1; **2)** Amostras representativas para o gene *bla*CTX-M 2; **3)** Amostras representativas para o gene *bla*CTX-M 9; **4)** Amostras representativas para os genes *bla*TEM e *bla*SHV; **5)** Amostras representativas para o gene *mcr*-1; **6)** Amostras representativas para o gene *bla*KPC. Fonte: autora.

Tabela 7. Distribuição de genes amplificados por isolado.

Genes	Pacientes	Granjas	Transportes	TOTAL	Percentual
<i>bla</i> TEM	44	44	3	93	53%
<i>bla</i> SHV	3	1	0	4	2%
<i>mcr</i> -1	2	3	0	5	3%
<i>mcr</i> -2	0	0	0	0	0%
<i>mcr</i> -3	0	0	0	0	0%
<i>mcr</i> -4	0	0	0	0	0%
<i>mcr</i> -5	0	0	0	0	0%
<i>bla</i> CTXM1	40	18	6	64	36%
<i>bla</i> CTXM2	2	9	0	11	6%
<i>bla</i> CTXM9	12	7	0	19	11%
<i>bla</i> KPC	12	34	0	46	26%
<i>bla</i> NDM	0	0	0	0	0%
TOTAL	77	85	11	173	100%

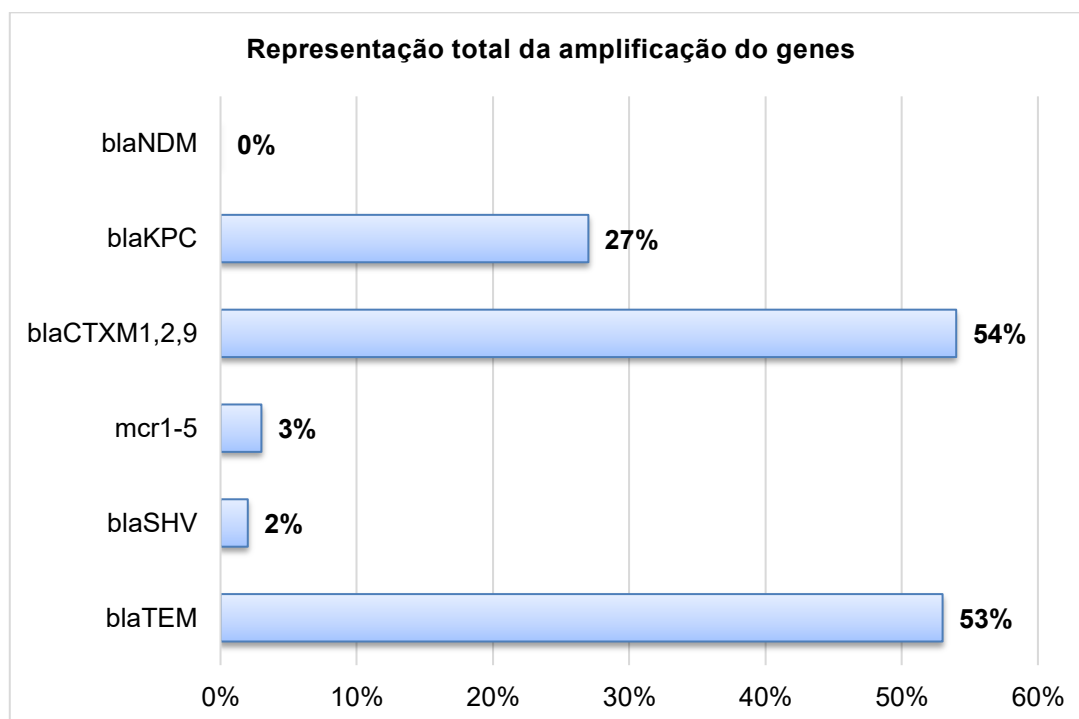
Fonte: autora.

Figura 53. Gráfico representativo da amplificação dos genes de resistência por tipo de amostra.



Fonte: autora.

Figura 54. Representação total da amplificação dos genes.



Fonte: autora.

Algumas amostras apresentaram mais de um gene identificado, portanto, gerou-se a intersecção de dados, para maior entendimento da presença desses genes nas amostras do estudo. Assim, observou-se que 118 amostras foram positivas para algum dos genes em estudo. E que os genes *bla*TEM (23%), *bla*TEM+*bla*CTXM1(21%),*bla*TEM+*bla*KPC (10%), *bla*TEM+*bla*CTXM1+*bla*KPC (4%), *bla*KPC (7%) e *bla*CTXM1 (14%), foram os genes mais prevalentes nos isolados obtidos durante o estudo. Estes dados são descritos na Tabela 8. Ressalta-se que os dados de *bla*NDM não foram plotados devido a ausência do gene nas amostras do estudo.

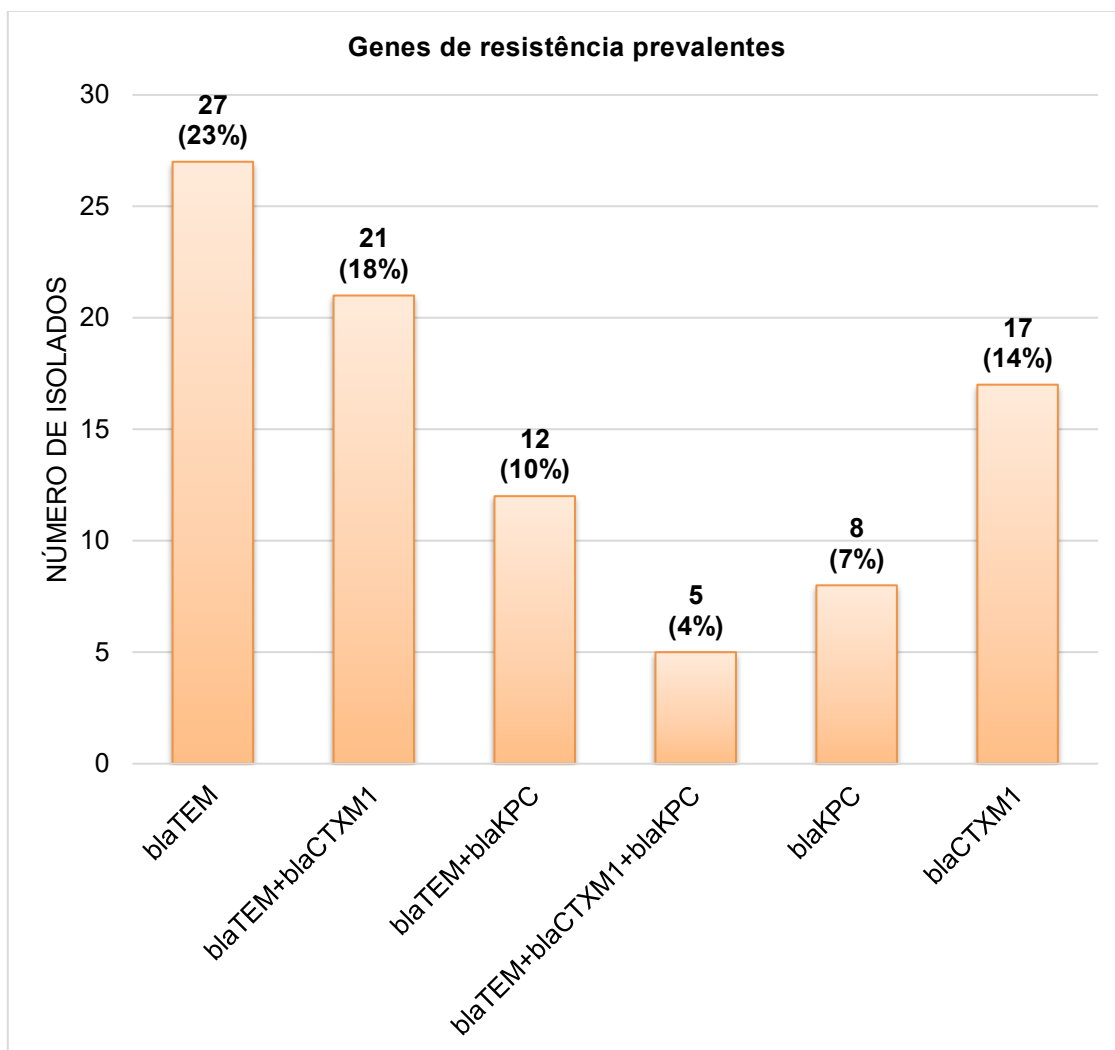
Tabela 8. Prevalência dos genes de resistência encontrados em cada tipo de amostra.

Genes de Resistência	Pacientes	Granjas	Transportes	TOTAL
<i>bla</i> TEM	11	15	1	27
<i>bla</i> TEM+ <i>bla</i> CTXM1+ <i>bla</i> CTXM2+ <i>bla</i> CTXM9	0	1	0	1
<i>bla</i> TEM+ <i>bla</i> CTXM1	15	4	2	21
<i>bla</i> TEM+ <i>bla</i> CTXM2	0	2	0	2
<i>bla</i> TEM+ <i>bla</i> CTXM9	2	1	0	3
<i>bla</i> TEM+ <i>bla</i> KPC	2	10	0	12
<i>bla</i> TEM+ <i>bla</i> SHV+ <i>bla</i> CTXM1+ <i>bla</i> KPC+ <i>bla</i> CTXM9	2	0	0	2
<i>bla</i> TEM+ <i>bla</i> CTXM1+ <i>bla</i> KPC	3	2	0	5
<i>bla</i> TEM+ <i>bla</i> CTXM1+ <i>bla</i> CTXM9+ <i>bla</i> KPC	2	0	0	2
<i>bla</i> TEM+ <i>bla</i> CTXM2+ <i>bla</i> KPC	0	3	0	3
<i>bla</i> TEM+ <i>bla</i> CTXM9+ <i>bla</i> KPC	0	1	0	1
<i>bla</i> TEM+ <i>mcr</i> -1+ <i>bla</i> KPC	1	2	0	3
<i>bla</i> TEM+ <i>mcr</i> -1+ <i>bla</i> CTXM1+ <i>bla</i> CTXM9	0	1	0	1
<i>bla</i> TEM+ <i>mcr</i> -1+ <i>bla</i> CTXM1-1	1	0	0	1
<i>bla</i> SHV+ <i>bla</i> KPC	0	1	0	1
<i>bla</i> CTXM1+ <i>bla</i> KPC	1	1	0	2
<i>bla</i> CTXM2+ <i>bla</i> KPC	0	1	0	1
<i>bla</i> CTXM9+ <i>bla</i> KPC	0	1	0	1
<i>bla</i> KPC	0	8	0	8
<i>bla</i> SHV	1	0	0	1
<i>bla</i> CTXM1	8	5	4	17
<i>bla</i> CTXM2	1	0	0	1
<i>bla</i> CTXM9	1	1	0	2
Total isolados positivos	-	-	-	118

A tabela corresponde a intersecção de valores, pois algumas amostras apresentaram mais de um gene positivo. Em destaque cinza os genes mais prevalentes. Fonte: autora.

Todos os dados a cima são resumidos na Figura 55, a qual dispõe os genes mais prevalentes nos isolados obtidos.

Figura 55. Gráfico dos genes de resistência mais prevalentes nos isolados obtidos.



Fonte: autora.

Em relação às amostras de pacientes coletas no período de internação e alta hospitalar, três pacientes apresentaram aumento no número de isolados bacterianos, como já discutido anteriormente no tópico 5.1. Por esse motivo, é dado destaque para os genes identificados nos isolados obtidos para esses 3 pacientes, assim, tal resultado é representado no Quadro 12.

Quadro 12. Quadro do número de isolados positivos para determinados genes de resistência para amostras de pacientes.

	Paciente 7				Paciente 8			Paciente 13		
Genes(<i>bla</i>)	TEM	CTX-M1	CTX-M9	KPC	TEM	CTX-M1	SHV	TEM	CTX-M1	CTX-M2
Internação	4	2	3	-	4	2	-	-	-	-
Alta	2	-	4	4	3	4	1	1	2	2

Legenda: Destaque em Vermelho: Paciente 7; Azul: Paciente 8 e Verde: Paciente 13

Fonte: autora

Perante tal resultado, é possível analisar que os três pacientes adquiriram novos genes de resistência durante sua estadia hospitalar, ou seja, foram detectados novos genes em amostras de alta, dos quais não foram identificados anteriormente nas amostras de internação. Entretanto, para o paciente 7 não foi identificado o gene *bla*CTX-M1 nas amostras de alta, o qual foi identificado nas amostras de internação. Já o paciente 13 não fez uso de antimicrobianos durante o período de internação e, foi observado que após a sua permanência no ambiente hospitalar, foi possível identificar diferentes genes de resistência bacteriana.

Outra observação, é que para as amostras de pacientes foram detectados genes de resistência para as principais classes de antimicrobianos prescritos para o tratamento durante o seu período de internação.

Deste modo, os resultados apresentados enaltecem à intervenção direta do microbioma do ambiente em que estes pacientes se encontravam e sua microbiota, ou seja, é evidenciado a transmissão direta de bactérias que carregam esses genes de resistência através de procedimentos clínicos realizados e a farmacoterapia vigente.

Já para os outros resultados, é observado que os isolados de granjas apresentaram destaque na positividade para *bla*KPC, uma carbapenemase de extrema relevância clínica. Porém, tal resultado se contrapõe aos resultados obtidos no Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA), pois nesse teste não foi observada uma resistência significativa para a classe dos carbapenêmicos. E já, no teste Blue-Carba foi possível identificar carbapenemase positiva apenas em amostras correspondente ao paciente 10.

Portanto, acredita-se que há a presença do gene nas amostras de granjas, porém, não foi possível a sua identificação de forma fenotípica.

E ainda para as amostras de granjas, foi observado o predomínio de genes que atuam através da enzima β -lactamase (*blaKPC*; *blaCTX-M* e *blaTEM*). Um resultado esperado, devido à antibioticoterapia a qual esses animais são submetidos, tendo em destaque às principais classes de β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas). Assim, demonstra-se a influência direta do tratamento com antimicrobianos e surgimento de cepas com genes de resistência.

Outra observação relevante, é que nas amostras de transportes foram identificados apenas dois genes de resistência (*blaTEM* e *blaCTX-M*) dos seis testados, juntamente com as suas intersecções. Resultado esperado devido à resistência detectada nessas amostras no TSA aos β -lactâmicos, principalmente à classe das penicilinas e cefalosporinas. Entretanto, atenta-se à permanência desses genes nas amostras de granjas e pacientes, ou seja, é pressuposto que esses genes apresentam uma transmissão de forma indireta entre paciente, granjas e transportes, já que os mesmos apresentam influências ambientais da sua região de origem.

A presença desses genes nos diferentes meios de estudo propostos, é também descrito por Wright e colaboradores(2010), onde o ambiente é considerado um reservatório de microrganismos resistentes e, que este resistoma faz parte da estrutura da população microbiana global e antecede o uso humano de antimicrobianos (WRIGHT, 2010).

5.7 Amplificação dos genes de resistência nos microrganismos identificados

Com a identificação de cada isolado, foi possível compreender a presença dos genes de resistência testados nos diversos microrganismos presentes nas amostras coletadas. Assim, os resultados obtidos dos microrganismos identificados com os correspondentes genes de resistência presentes são descritos nas tabelas seguintes, as quais são apresentadas separadamente para

cada tipo de amostra analisada (pacientes, granjas de suínos, granjas de aves, granjas de suínos orgânicos e transportes).

Para as amostras de pacientes destacou-se que para o total das amostras positivas, 56% delas foram positivas para o gene *bla*TEM e 52% para o gene *bla*CTX-M1. Sendo *Escherichia coli* o microrganismo que apresentou prevalência para esses dois genes, com 39% do isolados positivos para o gene *bla*TEM e 35% para o gene *bla*CTX-M1, os quais atuam na inibição dos antimicrobianos β -lactâmicos. Os dados totais obtidos para as amostras de pacientes são descritos no Quadro 13.

Quadro 13. Genes positivos nos microrganismos identificados nas amostras de pacientes.

Microrganismos	Genes identificados						
	<i>bla</i> TEM	<i>bla</i> SHV	<i>mcr</i> -1	<i>bla</i> CTXM1	<i>bla</i> CTXM2	<i>bla</i> CTXM9	<i>bla</i> KPC
<i>Escherichia coli</i>	39%	-	3%	35%	3%	10%	8%
<i>Proteus mirabilis</i>	1%	-	-	1%	-	-	1%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6%	4%	-	6%	-	4%	5%
<i>Morganella morganii</i>	1%	-	-	1%	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	3%	-	-	1%	-	-	-
<i>Providencia stuartii</i>	1%	-	-	1%	-	1%	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	1%	-	-	3%	-	-	-
<i>Klebsiella aerogenes</i>	-	-	-	1%	-	-	-
<i>Citrobacter braakii</i>	1%	-	-	1%	-	-	1%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1%	-	-	-	-	-	-
Soma:	56%	4%	3%	52%	3%	16%	16%

Fonte: autora.

Os resultados obtidos são compatíveis com o fenótipo encontrado no TSA, no qual foi identificada a prevalência de resistência das amostras de pacientes para a classe das Penicilinas e Cefalosporinas, as quais são as principais representantes do antimicrobianos β -lactâmicos. Assim, é possível relatar que os genes estão sendo expressos de forma a identificar um fenótipo correspondente.

Diversos trabalhos descrevem resultados semelhantes, como Dizaji e colaboradores (2016) que relataram a predominância do gene *bla*TEM em isolados de *Escherichia coli* em amostras clínicas.

Já o gene *bla*CTX-M1 é prevalente em plasmídeos de *Escherichia coli* (ALCOCK *et al.*, 2020) destacando-se principalmente em amostras clínicas. Os resultados encontrados para esse gene, também são demonstrados por

Onnenberg e colaboradores (2011), os quais identificaram que 64% dos isolados de *Escherichia coli* foram positivos para o gene *bla*CTX-M1.

Já para as amostras de transportes foram identificados apenas 2 dos genes testados. Portanto, das amostras positivas, 27% delas foram positivas para o gene *bla*TEM e 55% para o gene *bla*CTX-M1. O microrganismo em destaque para as resistências presente, foi *Pantoea agglomerans*, onde 27% dos isolados foram positivos para o gene *bla*CTX-M1 e 18% positivo para o gene *bla*TEM, conforme no Quadro 14.

Quadro 14. Genes positivos nos microrganismos identificados nas amostras de transportes.

Microrganismos	Genes identificados	
	<i>bla</i> TEM	<i>bla</i> CTXM1
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	-	9%
<i>Pantoea agglomerans</i>	18%	27%
<i>Cronobacter sp.</i>	9%	-
<i>Franconibacter pulveris</i>	-	9%
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	-	9%
Soma:	27%	55%

Fonte: autora.

Os resultados apresentados no Quadro 14 demonstram a predominância dos genes *bla*TEM e *bla*CTX-M1 nas amostras. Porém esses resultados não são compatíveis com o fenótipo obtido pelo TSA, pois foi observada uma predominância de resistência à classe das Penicilinas e Cefalosporinas no microrganismo *Franconibacter pulveris* e sendo identificada uma baixa porcentagem do gene *bla*CTX-M1. Assim, é possível relatar que os genes não estão sendo expressos de forma a serem identificados pela técnica de PCR ou as bactérias apresentam genes não amplificados pelos iniciadores utilizados, com isso justificando a presença de um fenótipo de resistência.

Para tais amostras é recomendada a realização de técnicas de sequenciamento para uma identificação mais precisa e ampla dos genes de resistência presentes.

Atualmente, existem poucas informações sobre *Pantoea agglomerans*, principalmente em relação à presença de genes de resistência nessas bactérias. As mesmas não são consideradas de relevância clínica, pois estão presentes no

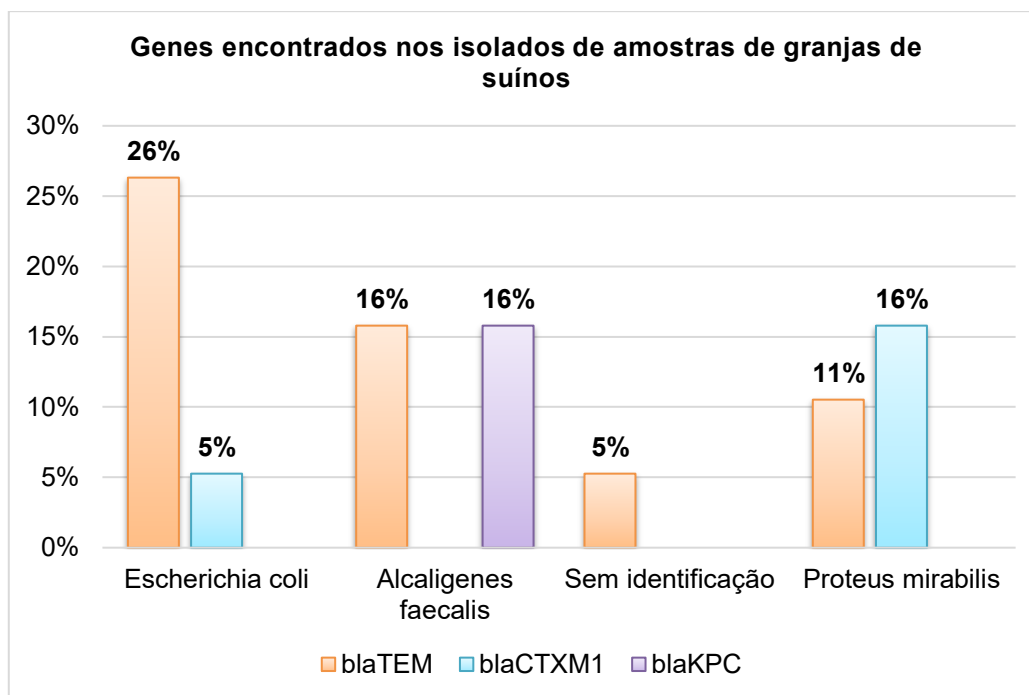
ambiente e não se sabe a origem da *Pantoea agglomerans* no ambiente hospitalar.

Entretanto, no presente trabalho foi possível identificar genes de resistência em isolados de *Pantoea agglomerans* advindos de transportes de pacientes, os quais tiveram contato direto com o ambiente hospitalar, assim, podendo ser considerado uma das principais portas de entrada das bactérias consideradas ambientais nos hospitais, possibilitando a disseminação desses genes de resistência.

Um estudo realizado por Büyükcım e colaboradores (2018), identificou que 21,4% dos isolados de *Pantoea agglomerans*, obtidos de amostras de pacientes pediátricos, foram resistentes à classe dos Carbapenêmicos, causando infecções nos pacientes. Apesar das discrepâncias encontradas nos resultados dos autores e no presente trabalho, principalmente em razão de serem amostras distintas, os autores dão ênfase na influência da *Pantoea agglomerans* como uma fonte para infecções adquiridas na comunidade e em hospitais e ao baixo número de informações sobre esse microrganismo.

Nas amostras de granjas de suínos observou-se que para os isolados de *Escherichia coli* 26% deles foram positivos para o gene *bla*TEM e 5% para o gene *bla*CTX-M1. Nos isolados de *Alcaligenes faecalis*, 16% deles foram positivos para o gene *bla*TEM e 16% para *bla*KPC. Já para os isolados de *Proteus mirabilis*, 11% deles foram positivos para o gene *bla*TEM e 16% para *bla*CTX-M1. E por fim, observou-se que nas amostras que não foram possíveis de serem identificadas, 5% foram positivas para o gene *bla*TEM, conforme ilustrado na Figura 56.

Figura 56. Genes encontrados nos microrganismos identificados nas amostras de granjas de suínos.



Fonte: autora.

Os resultados apresentados na Figura 56 assemelham-se aos descritos anteriormente, principalmente em relação à presença dominante dos genes de resistência *bla*TEM e *bla*CTX-M1 em isolados de *Escherichia coli*.

Nos isolados de *Alcaligenes faecalis* foi identificada a presença do gene *bla*TEM, sendo também observada ESBL positiva para uma das amostras desse microrganismo. Um resultado de extrema relevância, pois o primeiro relato da presença do gene *bla*TEM com presença de ESBL positiva, foi realizado por PuaH e colaboradores (2019), ou seja, são poucos relatos até hoje sobre tal espécie com a presença de tais genes de resistência.

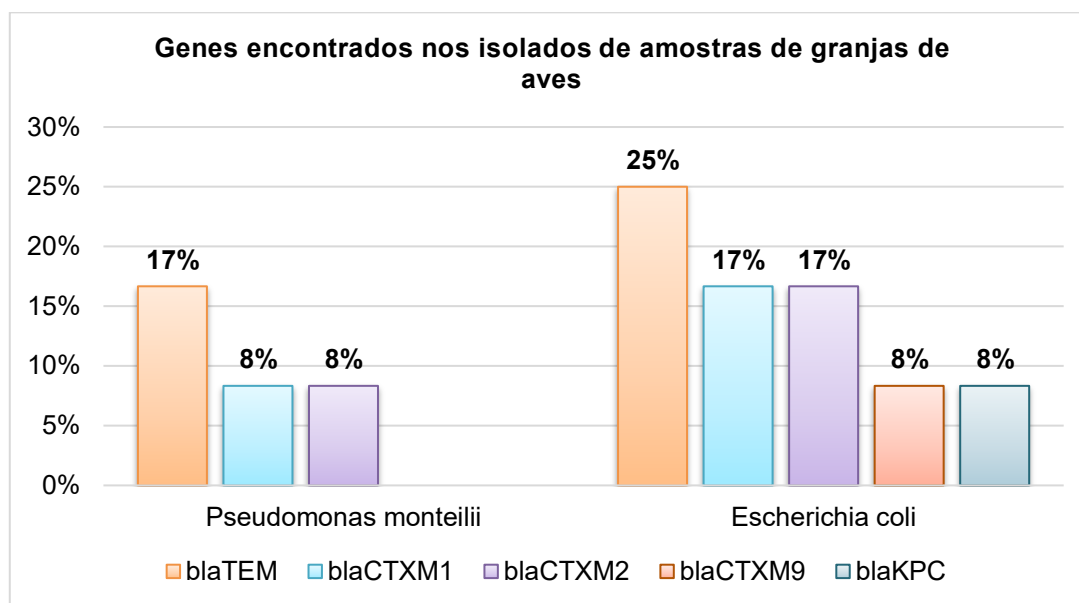
Já em relação à presença do gene *bla*KPC nos isolados de *Alcaligenes faecalis*, até o momento não existem relatos sobre a presença em isolados clínicos. Assim, provavelmente sendo o primeiro trabalho a descrever tal achado.

O mesmo ocorre para os genes identificados para os isolados de *Proteus mirabilis*, os quais são comumente associados à expressão dos genes: *ureC*, *zapA*, *rsmA*, *hmpA*, *mrpA*, *atfA* e *pmfA* (SUN *et al.*, 2020). Não havendo relatos sobre a presença dos genes *bla*TEM e *bla*CTX-M1 em tal microrganismo.

Nas amostras de granjas de aves verificou-se que nos isolados de *Pseudomonas monteilii*, 17% deles foram positivos para o gene *bla*TEM, 8% para *bla*CTX-M1 e 8% para *bla*CTX-M2. Já nos isolados de *Escherichia coli*, 25%

deles foram positivos para o gene *bla*TEM, 17% para *bla*CTX-M1, 17% para *bla*CTX-M2, 8% para *bla*CTX-M9 e 8% para *bla*KPC, conforme Figura 57.

Figura 57. Genes encontrados nos microrganismos identificados nas amostras de granjas de aves.



Fonte: autora.

Novamente os resultados são semelhantes para os isolados de *Escherichia coli*, porém para as amostras de granjas de aves foram identificados os genes *bla*CTX-M2, *bla*CTX-M9 e *bla*KPC, destacando-se a variabilidade de genes para o mesmo microrganismo. Tais identificações são compatíveis com o fenótipo encontrado no TSA, o qual apresenta predominância de resistência à classe das Penicilinas e Cefalosporinas e, baixa presença de resistência à classe dos Carbapenêmicos.

Em relação aos genes identificados nos isolados de *Pseudomonas monteilii*, são compatíveis com o fenótipo encontrado no TSA em relação à resistência à classe das Penicilinas e Cefalosporinas. Entretanto, destacou-se a presença predominante dos isolados de *Pseudomonas monteilii* resistentes aos antimicrobianos carbapenêmicos testados no TSA e, presença de ESBL positiva. Porém, nenhum dos isolados de *Pseudomonas monteilii* apresentou positividade para as enzimas carbapenemases, no teste Blue-carba realizado.

Assim, suspeita-se que o gene para carbapenemases não está sendo expresso porém, nos testes fenotípicos já é possível identificar essa resistência. Deste modo, para essas amostras é recomendada a realização da técnica de

sequenciamento, para uma identificação mais precisa dos genes de resistência presentes.

Os dados totais obtidos para as amostras de granjas de suínos orgânicos antes da limpeza e após a limpeza são descritos na Tabela 9.

Novamente, o microrganismo em destaque foi a *Escherichia coli*, apresentando à maioria dos genes identificados para os dois períodos de coleta.

Nesta análise, observa-se outra vez a predominância dos genes de resistência *bla*TEM e *bla*CTX-M1 em ambas as amostras. Entretanto, destacou-se a presença de *bla*KPC em ambos os períodos de coleta e, sendo este mais presente no período após limpeza desses locais.

Para tais amostras o fenótipo se apresentou correspondente aos genes de resistência identificados, principalmente, em razão da predominância de resistência à classe das Penicilinas e Cefalosporinas. Destaca-se que para o período após limpeza, foi observada uma predominância de resistência, também, à classe das Fluoroquinolonas.

Porém, o mesmo não ocorreu para o fenótipo para a resistência aos carbapenêmicos, pois apenas 16 isolados dos 54 isolados obtidos em granjas de suínos orgânicos foram resistentes à um dos carbapenêmicos testados, ou seja, uma representação de quase 30% das amostras. Essas amostras foram negativas no teste Blue-Carba, portanto, não apresentam enzimas carbapenemases. Mas, a partir dos resultados com a técnica de PCR, identificou-se a presença do gene e, acredita-se que na maioria das amostras há expressão do gene, porém de forma que ainda não seja possível a observação do seu fenótipo nos testes realizados. Apenas em algumas amostras foi observado referido fenótipo.

Tabela 9. Genes encontrados nos microrganismos identificados nas amostras de granjas de suínos orgânicos.

	Microrganismos	Genes Identificados						
		<i>bla</i> TEM	<i>bla</i> SHV	<i>mcr</i> 1	<i>bla</i> CTXM1	<i>bla</i> CTXM2	<i>bla</i> CTXM9	<i>bla</i> KPC
Granjas de Orgânicos (Antes da Limpeza)	<i>Pseudomonas monteilii</i>	-	-	-	-	5%	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	33%	5%	5%	14%	-	5%	19%
	Sem identificação	5%	-	-	5%	-	-	-
	<i>Proteus mirabilis</i>	14%	-	-	-	5%	5%	10%
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	-	5%	-	5%
	<i>Acinetobacter gernerii</i>	5%	-	-	-	5%	-	5%
	<i>Morganella morganii</i>	5%	-	-	-	-	-	-
	<i>Burkholderia cepacia</i>	-	-	-	-	-	-	5%
	Soma:	62%	5%	5%	19%	19%	10%	43%
Granjas de Orgânicos (Após Limpeza)	<i>Escherichia coli</i>	27%	-	6%	12%	3%	12%	33%
	Sem identificação	-	-	-	3%	-	-	3%
	<i>Proteus penneri</i>	-	-	-	-	-	-	3%
	<i>Proteus mirabilis</i>	3%	-	-	-	-	-	-
	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	3%	-	-	-	-	-	3%
	<i>Proteus hauseri</i>	3%	-	-	-	3%	-	3%
	<i>Morganella morganii</i>	6%	-	-	-	-	-	6%
	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	-	-	-	-	-	-	3%
	<i>Proteus penneri</i>	-	-	-	-	-	-	3%
	<i>Providencia rettgeri</i>	-	-	-	3%	-	-	3%
	<i>Pseudomonas guariconensis</i>	-	-	-	-	-	-	3%
	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	3%	-	-	-
Soma:	42%	0%	6%	21%	6%	12%	64%	

5.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima para Polimixina B

Foram testadas 31 amostras no ensaio de CIM para polimixina B, as quais correspondem a 6,4% de isolados obtidos em amostras de transportes, 38,7% de granjas de suínos orgânicos (após limpeza), 19,4% de granjas de suínos, 13% de granjas de suínos orgânicos (antes da limpeza) e, 19,4% de pacientes. Para essa análise, obteve-se concentrações entre 0,25 a 4096 µg/mL.

Diante disso, 58% das amostras testadas foram resistentes à polimixina B, seguindo o ponto de corte estabelecido pelo BrCAST. Sendo que 55,5% das amostras resistentes foram de isolados de *Escherichia coli*, 27,7% de *Alcaligenes faecalis*, 11,1% de *Ochrobactrum intermedium* e 5,5% *Stenotrophomonas maltophilia*.

Destaca-se que 80% dos isolados positivos para o gene *mcr 1* testados apresentaram resistência à Polimixina B, sendo todos isolados de *Escherichia coli*.

Todas as amostras que apresentaram crescimento de colônias dentro do halo no teste de triagem com a colistina, foram sensíveis à polimixina B. Já as amostras que foram resistentes no teste da colistina, 77,7% das mesmas foram resistentes à Polimixina B. Os resultados descritos são representados na Tabela 10.

Tabela 10. Concentração inibitória Mínima para Polimixina B.

	Tipo de amostra	Microrganismo	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Interpretação
Amostras com colônias no halo	Transporte	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	2	Sensível
	Transporte	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	2	Sensível
	Granja de orgânicos (Depois da limpeza)	<i>Escherichia coli</i>	0,25	Sensível
	Granja de suínos	Sem identificação	0,25	Sensível
	Granja de orgânicos (Depois da limpeza)	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	1	Sensível
	Granja de orgânicos (Depois da limpeza)	<i>Escherichia coli</i>	0,5	Sensível
	Granja de orgânicos (Depois da limpeza)	Sem identificação	0,25	Sensível
	Granja de orgânicos (Depois da limpeza)	<i>Escherichia coli</i>	0,5	Sensível
Amostras com o gene <i>mcr 1</i> (+)	Paciente	<i>Escherichia coli</i>	16	Resistente
	Paciente	<i>Escherichia coli</i>	16	Resistente
	Granja de orgânicos (Antes da limpeza)	<i>Escherichia coli</i>	16	Resistente
	Granja de orgânicos (Depois da limpeza)	<i>Escherichia coli</i>	32	Resistente
	Granja de orgânicos (Depois da limpeza)	<i>Escherichia coli</i>	0,25	Sensível
Amostras que apenas apresentaram resistência no teste da colistina	Paciente	<i>Escherichia coli</i>	16	Resistente
	Paciente	<i>Escherichia coli</i>	16	Resistente
	Paciente	<i>Escherichia coli</i>	16	Resistente
	Paciente	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,25	Sensível
	Granja de aves	<i>Escherichia coli</i>	0,25	Sensível
	Granja de suínos	<i>Alcaligenes faecalis</i>	4	Resistente
	Granja de suínos	<i>Alcaligenes faecalis</i>	32	Resistente
	Granja de orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	32	Resistente

(Antes da limpeza)			
Granja de orgânicos (Depois da limpeza)	<i>Escherichia coli</i>	4096	Resistente
Granja de orgânicos (Depois da limpeza)	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	0,25	Sensível
Granja de orgânicos (Depois da limpeza)	Sem identificação	1	Sensível
Granja de orgânicos (Antes da limpeza)	<i>Escherichia coli</i>	32	Resistente
Granja de suínos	<i>Alcaligenes faecalis</i>	16	Resistente
Granja de suínos	<i>Alcaligenes faecalis</i>	32	Resistente
Granja de suínos	<i>Alcaligenes faecalis</i>	32	Resistente
Granja de orgânicos (Antes da limpeza)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	256	Resistente
Granja de orgânicos (Depois da limpeza)	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	32	Resistente
Granja de orgânicos (Depois da limpeza)	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	32	Resistente

Fonte: autora.

Os resultados obtidos ressaltam novamente à resistência presente nas amostras de granjas de suínos orgânicos no período após a limpeza, a qual apresentou uma porcentagem de resistência à polimixina B superior em comparação às outras amostras testadas. Uma das hipóteses é que a limpeza também remove a matéria orgânica presente, a qual pode inibir a PCR ou reduzir a representatividade dos microrganismos na cultura.

Através do CIM realizado observou-se coerência dos resultados obtidos para os isolados positivos para o gene *mcr1*, onde 80% das amostras testadas apresentaram resistência à polimixina B, assim, o gene *mcr1* foi expresso de forma a observar o fenótipo de resistência através do presente teste. E, também, indicando a efetividade da técnica de PCR.

A mesma análise foi realizada nos isolados resistentes no teste de triagem com a colistina, pois, 77,7% dos isolados que apresentaram resistência à colistina também apresentaram resistência à polimixina B, assim, sugere-se a efetividade do teste com a Colistina (“Colistin- *Drop Test*”).

A resistência à polimixina B indentificada em tais microrganismos destaca-se a predominância de 55,5% em isolados de *Escherichia coli*, sendo esse um resultado compatível com a literatura científica. Pois segundo Wang e colaboradores (2020), as polimixinas têm sido frequentemente usadas para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas MDR. Nos últimos anos, as resistências aos antimicrobianos polimixina B e colistina aumentaram em isolados de *Escherichia coli*.

Já em relação a presença do gene *mcr-1*, Peng e colaboradores (2019) ressaltam a associação de tal gene à resistência à colistina, sendo esse o primeiro gene de resistência à colistina transmitido por plasmídeo móvel descoberto e, é o tipo de *mcr* predominante na China. Já no estudo realizado por Wang e colaboradores (2020), todos os isolados de *Escherichia coli* resistentes à polimixina B foram positivos para *mcr-1*, o que é consistente com pesquisas anteriores (PENG *et al.*, 2019).

6. SUMÁRIO DE RESULTADOS

- ✓ Foi obtido um total de 256 isolados bacterianos correspondentes às amostras de granjas, pacientes e transportes. Desses, 173 (68%) isolados eram de Bacilos Gram-negativos, os quais foram utilizados no presente trabalho.
- ✓ 13% dos isolados totais foram caracterizados como bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose.
- ✓ Observou-se que apenas 6% dos isolados obtidos correspondem às amostras de transportes, 50% para as amostras de granjas e 44% para as amostras de pacientes.
- ✓ Nos 173 isolados foram encontrados majoritariamente *Escherichia coli* (51%), a qual é caracterizada como um microrganismo de grande prevalência em amostras de caráter clínico e/ou de origem fecal.
- ✓ Predominantemente 87% das amostras pertencem à ordem *Enterobacterales*.
- ✓ Para as amostras fermentadoras de glicose observou-se que os isolados apresentaram resistência às seguintes classes de antimicrobianos: 73% às Penicilinas, 55% às Cefalosporinas, 8% aos Carbapenêmicos, 18% aos Monobactâmicos, 41% às Fluoroquinolonas, 39% aos Aminoglicosídeos, 3% às tetraciclina e 59% à classe de Agentes Diversos (Fosfomicina 200µg, Nitrofurantoina 100µg e Sulfametoxazol + Trimetoprim 23,75/1,25 µg), a qual é definida pelo BrCAST.
- ✓ Para as amostras de bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose (BGN-NF) observou-se que os isolados apresentaram resistência às seguintes classes de antimicrobianos: 91% às Cefalosporinas, 83% aos Carbapenêmicos, 83% aos Monobactâmicos, 100% às Fluoroquinolonas e 100% à classe de Agentes Diversos (Sulfametoxazol + Trimetoprim), a qual é definida pelo BrCAST.

- ✓ O microrganismo predominante nas amostras foi a *Escherichia coli*, a qual apresentou resistência de 72% à classe das Penicilinas, 43% às Cefalosporinas, 3% aos Carbapenêmicos, 20% aos Monobactâmicos, 44% às Fluoroquinolonas, 39% aos Aminoglicosídeos, 1% às Tetraciclinas e 48% aos Agentes Diversos (Fosfomicina, Nitrofurantoína e Sulfametoxazol+Trimetropim).
- ✓ Foram obtidos 50 isolados de granjas positivos para ESBL, dos quais 23 isolados correspondem à granja de suínos orgânicos, 9 isolados de granjas de suínos e 14 isolados de granjas de aves e, 4 isolados de pacientes foram positivos para ESBL, não sendo observado a presença de ESBL nas amostras de transportes.
- ✓ 31 amostras apresentaram resistência aos carbapenêmicos no TSA e, dessas apenas 3 amostras foram positivas para a enzima carbapenemase, por meio do teste de detecção rápida de carbapenemases direto de placas de cultivo.
- ✓ Observou-se que 31% dos isolados obtidos apresentaram o gene *blaKPC*, 53% para o gene *blaCTX-M* do tipo 1, 2 e 9, 53% para o gene *blaTEM*, 3% para o gene *mcr-1*, 2% para o gene *blaSHV* e por fim, não foram identificados isolados positivos para o gene *blaNDM*.
- ✓ 130 amostras foram positivas para algum dos genes em estudo. E que os genes *blaTEM* (20,7%), *blaTEM+blaCTXM* (22,6%), *blaTEM+blaKPC* (9,2%), *blaTEM+ blaCTXM+blaKPC* (12,4%), *blaKPC* (8%) e *blaCTXM* (13,9%) foram os genes mais prevalentes nos isolados obtidos durante o estudo.
- ✓ Para as amostras de pacientes destacou-se que para o total das amostras positivas, 56% delas foram positivas para o gene *blaTEM* e 52% para o gene *blaCTX-M1*. *Escherichi coli* foi o microrganismo que apresentou prevalência para esses dois genes, com 39% do isolados positivos para o gene *blaTEM* e 35% para o gene *blaCTX-M1*.

- ✓ Para as amostras de transportes foram identificados apenas 2 dos genes testados. Portanto, das amostras positivas, 27% delas foram positivas para o gene *bla*TEM e 55% para o gene *bla*CTX-M1. O microrganismo em destaque para as resistências presente, foi a *Pantoea agglomerans*, onde 27% dos isolados foram positivos para o gene *bla*CTX-M1 e 18% positivo para o gene *bla*TEM
- ✓ Nas amostras de granjas de suínos observou-se que para os isolados de *Escherichia coli*, 26% deles foram positivos para o gene *bla*TEM e 5% para o gene *bla*CTX-M1. Nos isolados de *Alcaligenes faecalis*, 16% deles foram positivos para o gene *bla*TEM e 16% para *bla*KPC. Já para os isolados de *Proteus mirabilis*, 11% deles foram positivos para o gene *bla*TEM e 16% para *bla*CTX-M1. E por fim, observou-se que nas amostras que não foram possíveis de serem identificadas, 5% foram positivas para o gene *bla*TEM.
- ✓ Nas amostras de granjas de aves verificou-se que nos isolados de *Pseudomonas monteilii*, 17% deles foram positivos para o gene *bla*TEM, 8% para *bla*CTX-M1 e 8% para *bla*CTX-M2. Já nos isolados de *Escherichia coli*, 25% deles foram positivos para o gene *bla*TEM, 17% para *bla*CTX-M1, 17% para *bla*CTX-M2, 8% para *bla*CTX-M9 e 8% para *bla*KPC.
- ✓ Na amostras de granjas de suínos orgânicos, o microrganismo em destaque foi a *Escherichia coli*, apresentando a maioria dos genes identificados para os dois períodos de coleta. Com tais resultados, observa-se outra vez a predominância dos genes de resistência *bla*TEM e *bla*CTX-M1 em ambas as amostras. Entretanto, destacou-se a presença *bla*KPC em ambos os períodos de coleta e, sendo este mais presente no período de após limpeza desses locais.
- ✓ Para a determinação da concentração mínima para Polimixina B, foram testadas 31 amostras, as quais correspondem a 6,4% de isolados obtidos em amostras de transportes, 38,7% de granjas de suínos orgânicos (após limpeza), 19,4% de granjas de suínos, 13%

de granjas de orgânicos (antes da limpeza) e, 19,4% de pacientes. Assim, obteve-se concentrações entre 0,25 a 4096 µg/mL.

- ✓ 58% das amostras testadas foram resistentes à Polimixina B, seguindo o ponto de corte estabelecido pelo BrCAST. Sendo que 55,5% das amostras resistentes foram de isolados de *Escherichia coli*, 27,7% de *Alcaligenes faecalis*, 11,1% de *Ochrobactrum intermedium* e 5,5% *Stenotrophomonas maltophilia*.

7. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos, foi possível compreender a influência dos diferentes ambientes na disseminação de MRA. Portanto, a coleta de amostras de granjas de animais e do ambiente hospitalar possibilitou descrever a disseminação das resistências no estado de Santa Catarina, com base no contexto de saúde única (“*One health*”), apesar das limitações encontradas, como baixo número de amostras, e incompatibilidade entre fenótipo e genótipo de determinados isolados.

As amostras caracterizam-se como 50% advindas de granjas de animais, das quais há predominância de amostras de granjas de suínos orgânicos. Tais amostras foram obtidas em dois períodos de coleta, destacando-se a obtenção de maior número de isolados no período de coleta após a limpeza de abrigo desses animais.

Diante disso, isolados resistentes às Penicilinas (73%) e às Cefalosporinas (55%) foram predominantes em amostras de granjas de suínos orgânicos do período após limpeza, tendo como principal microrganismo identificado a *Escherichia coli* (51%), com a prevalência dos genes de resistência *bla*TEM (53%) e *bla*CTX-M1 (36%).

Referente às amostras advindas de pacientes, evidencia-se que três pacientes adquiriram novos genes de resistência durante sua estadia hospitalar, ou seja, foram detectados novos genes em amostras de alta, dos quais não foram identificados anteriormente nas amostras de internação. Assim, tais dados salientam a importância direta do meio ambiente na transmissão de genes de resistência, principalmente tratando-se do ambiente hospitalar.

Portanto, todas as técnicas utilizadas para a detecção de microrganismos resistentes aos antimicrobianos apresentaram-se eficazes, porém, para amostras em que há presença dos genes de resistência mas não o fenótipo do TSA, recomenda-se a técnica de sequenciamento para a confirmação dos resultados obtidos.

8. SUGESTÕES

- Realizar a CIM para determinados antimicrobianos para os isolados que apresentaram diferença entre fenótipo e genótipo identificados. Caso, o teste CIM não apresente os resultados esperados, recomenda-se o sequenciamento completo das amostras, para a confirmação da presença de genes de resistência bacteriana não testados no presente trabalho.
- Proporcionar o *feedback* dos resultados encontrados nas granjas de suínos orgânicos. Para recomendar-se novos protocolos de higienização desses locais, conforme é preconizado pela Embrapa (2013). Sendo necessária uma regulamentação nacional para o monitoramento desses procedimentos de limpeza.
- Sugere-se um maior controle dos processos de higienização e desinfecção realizados nos transportes de pacientes, sejam esses transportes de emergência ou não. A conscientização e preocupação dos motoristas sobre o assunto foi observada durante as coletas. Portanto, é necessário o desenvolvimento de projetos de extensão ou de pesquisa que envolvam a realização ou ensinamento da higienização de modo adequado desses veículos. O treinamento pode seguir as diretrizes do documento da CCIH (2007), em que são descritos os processos de limpeza e desinfecção diária em transportes de caráter emergencial.
- Viabilizar os resultados encontrados nas amostras de pacientes à CCIH do hospital universitário da UFSC, para elaboração de protocolos e treinamentos de contingência da disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos no ambiente hospitalar.

9. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 96, n. 4, p. 271–281, 2005.

ABUBAKAR, R. H. *et al.* Antimicrobial usage in pig production: Effects on Escherichia coli virulence profiles and antimicrobial resistance. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, v. 86, n. 1, p. e1–e11, out. 2019.

ALCOCK, B. P. *et al.* CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. **Nucleic acids research**, v. 48, n. D1, p. D517–D525, jan. 2020.

ALLOCATI, N. *et al.* Escherichia coli in Europe: an overview. **International journal of environmental research and public health**, v. 10, n. 12, p. 6235–6254, nov. 2013.

AMARANTE, J. F. *et al.* RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS OBTIDAS DE CARPAS (*Cyprinus carpio*) CULTIVADAS EM SISTEMA SEMI-INTENSIVO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, n. 0, 8 mar. 2018.

AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 1980.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 465–478, 2014.

ANVISA. **MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE**, 2013. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item>

/procedimentos-laboratoriais-da-requisicao-do-exame-a-analise-microbiologica-e-laudo-final>

B., M. V.; D., C. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 775–790, 2012.

BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A. What's new in antibiotic resistance?

Focus on beta-lactamases. **Drug resistance updates**, v. 9, n. 3, p. 142–156, 2006.

BACANLI, M.; BACSARAN, N. Importance of antibiotic residues in animal food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 462–466, 2019.

BARROS, M. R. et al. Resistência antimicrobiana e perfil plasmidial de *Escherichia coli* isolada de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 405–410, 2012.

BENGTSSON-PALME, J.; KRISTIANSOON, E.; LARSSON, D. G. J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 42, n. 1, p. fux053, 2018.

BERTONCHELI, C. H. R. A review on metallo- β -lactamases. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2008.

BOUDJEMAA, H. et al. Molecular drivers of emerging multidrug resistance in *Proteus mirabilis* clinical isolates from Algeria. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 18, p. 249–256, 2019.

BRADFORD, S. A. et al. Transport and fate of microbial pathogens in agricultural settings. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 8, p. 775–893, 2013.

BRCAS.T. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e**

diâmetros de halos ., 2020. Disponível em:
<file:///C:/Users/carol/Downloads/Tabela-pontos-de-corte-clinicos-BrCAST-2020-V2-20-maio-2020 (4) (2).pdf>

BRISOLA, M. C. *et al.* Escherichia coli used as a biomarker of antimicrobial resistance in pig farms of Southern Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 647, p. 362–368, 2019.

BRUKER. **MALDI Biotyper CA System Package Insert Reference Library**, 2019.

BUROW, E. *et al.* Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine E. coli – A systematic review. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 4, p. 364–375, 2014.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 2, mar. 2020.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211, 1995.

BÜYÜKCAM, A. *et al.* Clinical and microbiological characteristics of Pantoea agglomerans infection in children. **Journal of infection and public health**, v. 11, n. 3, p. 304–309, 2018.

CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. **Threat Report**, p. 50–52, 2013.

CHENG, A. C. *et al.* Control of fluoroquinolone resistance through successful regulation, Australia. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 9, p. 1453, 2012.

CLSI. **M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility**

Testing, 2018. Disponível em: <<http://file.qums.ac.ir/repository/mmrc/CLSI-2018-M100-S28.pdf>>

COLE, D. *et al.* Dana Cole, Georgia Division of Public Health, Notifiable Disease Section, Department of Human Resources, 2 Peachtree Free-living Canada Geese and Antimicrobial Resistance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 935, 2005.

COPAN ITALIA. **eSwab - Package insert and How to use guide**, 2016. Disponível em: <http://www.copanusa.com/files/4214/9580/9714/HPC030_eSwab_copoliestere_Rev00_Date2016.02.pdf>

CUNNINGHAM, A. A.; DASZAK, P.; WOOD, J. L. N. One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 372, n. 1725, jul. 2017.

DALLENNE, C. *et al.* Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490–495, 2010.

DALTON, K. R. *et al.* One Health in hospitals: how understanding the dynamics of people, animals, and the hospital built-environment can be used to better inform interventions for antimicrobial-resistant gram-positive infections. **Antimicrobial resistance and infection control**, v. 9, n. 1, p. 78, jun. 2020.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging Infectious Diseases of Wildlife-- Threats to Biodiversity and Human Health. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 443–449, 2000.

DAVIES, S. C. *et al.* Annual Report of the Chief Medical Officer: infection and the rise of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 381, n. 9878, p. 1606–1609, 2013.

DE MELLO, M. S.; OLIVEIRA, A. C. Panorama das ações de combate à resistência bacteriana em hospitais de grande porte. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 29, p. e3407--e3407, 2021.

DE OLIVEIRA CUNHA, V. Bactérias multirresistentes: Klebsiella pneumoniae carbapenemase enzima KPC nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). 2014.

DE QUEIROZ, N. S. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 13, n. Esp, p. 64–70, 2004.

DEWAAL, S. **Antibiotic Resistance in Foodborne Pathogens: Evidence of Need for a Risk Management Strategy**, Center of the Science in Public Interest, 2012. Disponível em: <<http://cspinet.org/new/pdf/abrupdate.pdf>>

DIZAJI, A. S.; FATHI, R.; SALES, A. J. Molecular study of extended-spectrum beta-lactamase (TEM-1) gene in Escherichia Coli isolates collected from Ostad Alinasab Hospital in Tabriz Iran. 2016.

EL-HALFAWY, O. M.; VALVANO, M. A. Antimicrobial Heteroresistance: an Emerging Field in Need of Clarity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 191–207, 2015.

EPAGRI. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina. **Florianópolis: Epagri/Cepa**, 2017.

EPAGRI. **Valor Bruto da Produção Agropecuária de SC cresce 8,8% e chega a R\$ 33,6 bilhões, 2020.** Disponível em: <<https://www.epagri.sc.gov.br/index.php/2020/06/18/valor-bruto-da-producao-agropecuaria-de-sc-cresce-88-e-chega-a-r-336-bilhoes/>>

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. OXA β -lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 2, p. 241–263, abr. 2014.

FDA. **CVM Updates-CVM Reports on Antimicrobials Sold or Distributed for Food-Producing Animals (Food Drug Admin, Silver Spring. MD).**, 2010. Disponível em: <www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm236143.htm>.

FDA. **FDA annual summary report on antimicrobials sold or distributed in 2012 for use in food-producing animals.**, 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm416974.htm>>

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 4, p. 661–681, 2012.

FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature protocols**, v. 4, n. 5, p. 732–742, 2009.

G., W. *et al.* Isolation and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:6,8) in Broiler Chickens. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1–7, 2016.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, S. *et al.* Detection of Carbapenemase Production in a Collection of Enterobacteriaceae with Characterized Resistance Mechanisms from Clinical and Environmental Origins by Use of Both Carba NP and Blue-Carba Tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 464 LP – 466, 1 fev. 2016.

GUSTAFSON, R. H.; BOWEN, R. E. Antibiotic use in animal agriculture. **Journal of applied microbiology**, v. 83, n. 5, p. 531–541, 1997.

HAMPTON, T. Report reveals scope of US antibiotic resistance threat. **Jama**, v. 310, n. 16, p. 1661–1663, 2013.

HARBARTH, S. *et al.* Antimicrobial resistance: One world, one fight! **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 4, 2015.

HU, Y.; CHENG, H. **Research opportunities for antimicrobial resistance control in China's factory farming** ACS Publications, , 2014.

HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; IMMERSEEL, F. VAN. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 2, p. 182–188, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo Demográfico 2010**, 2010. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 5 nov. 2014

JANG, J. *et al.* Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 3, p. 570–581, set. 2017.

JOBINS, S. E.; ALEXANDER, K. A. From whence they came—antibiotic-resistant Escherichia coli in African wildlife. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 51, n. 4, p. 811–820, 2015.

JOUY, E. *et al.* Improvement in routine detection of colistin resistance in E. coli isolated in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Microbiological Methods**, v. 132, p. 125–127, 2017.

JUKES, T. H. *et al.* Growth-promoting effect of aureomycin on pigs. **Arch. Biochem.**, v. 26, p. 324–325, 1950.

KORB, A. *et al.* Tipagem molecular e resistência aos antimicrobianos em isolados de Escherichia coli de frangos de corte e de tratadores na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 258–264, 2015.

KUMARASAMY, K. K. *et al.* Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 10, n. 9, p. 597–602, set. 2010.

LEI, T. *et al.* First detection of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in virulent *Vibrio parahaemolyticus*. **International journal of food microbiology**, v. 308, p. 108290, 2019.

LESCAT, M.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Rapid multiplex polymerase chain reaction for detection of *mcr-1* to *mcr-5* genes. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 92, n. 4, p. 267–269, 2018.

LIAKOPOULOS, A.; MEVIUS, D.; CECCARELLI, D. A review of SHV extended-spectrum β -lactamases: neglected yet ubiquitous. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1374, 2016.

LING, L. L. *et al.* A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 455–459, 2015.

LIU, J. *et al.* Association of antibiotic resistance with SHV-12 extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacter cloacae*. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 11, n. 1, p. 269–276, jan. 2016a.

LIU, Y.-Y. *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 2016b.

LIVERMORE, D. M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 557–584, 1995.

LOUREIRO, R. J. *et al.* Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, p. 77–84, 2016.

LUPPI, A. *et al.* Antimicrobial Resistance of F4+ Escherichia Coli Isolated from Swine in Italy. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, n. 1, p. 67–71, 2015.

MAGIORAKOS, A.-P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MARON, D. F.; SMITH, T. J. S.; NACHMAN, K. E. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. **Globalization and health**, v. 9, n. 1, p. 48, 2013.

MASSOVA, I.; MOBASHERY, S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 1–17, 1998.

MATSUMOTO, Y. *et al.* Novel plasmid-mediated beta-lactamase from Escherichia coli that inactivates oxyimino-cephalosporins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 32, n. 8, p. 1243–1246, 1988.

MOORE, P. R. *et al.* Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. **J. biol. Chem**, v. 165, n. 2, p. 437–441, 1946.

MUAZ, K. *et al.* Antibiotic residues in chicken meat: global prevalence, threats, and decontamination strategies: a review. **Journal of food protection**, v. 81, n. 4, p. 619–627, 2018.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, abr. 2016.

MWANGI, W.; DE FIGUEIREDO, P.; CRISCITIELLO, M. F. One Health: Addressing Global Challenges at the Nexus of Human, Animal, and Environmental Health. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 9, p. e1005731–e1005731, 15

set. 2016.

NATURE. **Progress on antibiotic resistance.**NatureEngland, out. 2018.

NCBI. **Reference Gene Catalog.** Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#blaCTX-M>>. Acesso em: 31 maio. 2021.

NGANGOM, B. L. *et al.* Antibiotic residues in food animals: Public health concern. **Acta Ecologica Sinica**, v. 39, n. 5, p. 411–415, 2019.

NODARI, C. S.; BARTH, A. L. Resistência a antimicrobianos em enterobactérias: foco em carbapenemases. **Journal of Infection Control**, v. 5, n. 1, 2016.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 9, p. 821–830, 2014.

O'NEILL, J. **Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations**, 2014.

ONNBERG, A. *et al.* Molecular and phenotypic characterization of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum β -lactamases with focus on CTX-M in a low-endemic area in Sweden. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 119, n. 4–5, p. 287–295, abr. 2011.

OPLUSTIL, CARMEN PAZ, ZOCCOLI CASSIA, TOBOUTI NINA, S. M. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 4 ed ed. 2019

ORGANIZATION, W. H. **GLOBAL ACTION PLAN ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE**, 2015. Disponível em:
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf?sequence=1>

OSMAN, K. *et al.* Pseudomonas species isolated from camel meat: quorum sensing-dependent virulence, biofilm formation and antibiotic resistance. **Future microbiology**, v. 14, p. 609–622, maio 2019.

PARK, S. Y. *et al.* Emergence of Third-Generation Cephalosporin-Resistant Morganella morganii in a Captive Breeding Dolphin in South Korea. **Animals : an open access journal from MDPI**, v. 10, n. 11, nov. 2020.

PENG, Z. *et al.* Characteristics of Carbapenem-Resistant and Colistin-Resistant Escherichia coli Co-Producing NDM-1 and MCR-1 from Pig Farms in China. **Microorganisms**, v. 7, n. 11, 2019.

PITOUT, J. D. D. *et al.* The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 1, dez. 2019.

PUAH, S. M.; CHUA, K. H. First report of TEM-116 and OXA-10 extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of Alcaligenes species from Kuala Lumpur, Malaysia. **Japanese journal of infectious diseases**, p. JJID--2018, 2019.

RABINOWITZ, P. M. *et al.* Incorporating one health into medical education. **BMC medical education**, v. 17, n. 1, p. 45, 23 fev. 2017.

RADOVANOVIC, R. S. *et al.* Biofilm Production and Antimicrobial Resistance of Clinical and Food Isolates of Pseudomonas spp. **Current microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4045–4052, dez. 2020.

ROCCHETTI, T. T. Detecção Bacteriana e de Genes de Resistência a Antimicrobianos pela Técnica de PCR em Tempo Real em Infecções de Corrente Sanguínea de Pacientes Submetidos a Transplante de Órgãos Sólidos. **UNIFESP**, 2010.

ROTH, N. *et al.* The application of antibiotics in broiler production and the

resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. **Poultry science**, v. 98, n. 4, p. 1791–1804, abr. 2019.

RUPP, M. E.; FEY, P. D. Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing Enterobacteriaceae. **Drugs**, v. 63, n. 4, p. 353–365, 2003.

RYU, S.-H. *et al.* Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 14–18, 2012.

SCIH / CCIH. **BIOSSEGURANÇA PARA AMBULÂNCIAS**, 2007. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/3911058-Biosseguranca-para-ambulancias.html>>

SHEAHAN, T. *et al.* Rapid metagenomics analysis of EMS vehicles for monitoring pathogen load using nanopore DNA sequencing. **PloS one**, v. 14, n. 7, p. e0219961, 2019.

SKURNIK, D. *et al.* Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1215–1219, 2006.

SMITH, K. F. *et al.* Global rise in human infectious disease outbreaks. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, n. 101, p. 20140950, 2014.

SOUZA, J. C. P. V. B. *et al.* Sistema de produção de leitões baseado em planejamento, gestão e padrões operacionais. **Embrapa Suínos e Aves-Sistema de Produção (INFOTECA-E)**, 2013.

STOKSTAD, R. *et al.* THE MULTIPLE NATURE OF THE ANIMAL PROTEIN FACTOR. 1949.

SUN, Y. *et al.* Association among biofilm formation, virulence gene expression, and antibiotic resistance in *Proteus mirabilis* isolates from diarrhetic animals in

Northeast China. **BMC veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 176, jun. 2020.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 275–277, 2006.

TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Economics of antibiotic use in US swine and poultry production. **Choices**, v. 30, n. 316-2016–7752, 2015.

TENOVER, F. C. *et al.* Detection of colonization by carbapenemase-producing Gram-negative bacilli in patients by use of the Xpert MDRO assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 11, p. 3780–3787, 2013.

TOLEDO, A. *et al.* Prevalence of virulence genes in Escherichia coli strains isolated from piglets in the suckling and weaning period in Mexico. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 148–156, 2012.

TUMBARELLO, M. *et al.* Bloodstream infections caused by extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 498–504, 2006.

VAN BOECKEL, T. P. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 2015.

VAN DEN BOGAARD, A. E. J. M.; LONDON, N.; STOBBERINGH, E. E. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from The Netherlands (five abattoirs) and Sweden. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 5, p. 663–671, 2000.

VENTER, H. *et al.* Development and transmission of antimicrobial resistance among Gram-negative bacteria in animals and their public health impact. **Essays in Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 23–35, 2017.

WANG, Y. *et al.* Genetic diversity, antimicrobial resistance and extended-spectrum β -lactamase type of *Escherichia coli* isolates from chicken, dog, pig and yak in Gansu and Qinghai Provinces, China. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 726–732, 2020.

WELDHAGEN, G. F. Integrons and β -lactamases—a novel perspective on resistance. **International journal of antimicrobial agents**, v. 23, n. 6, p. 556–562, 2004.

WHO. Containing antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland: WHO. **WHO Policy Perspectives on Medicines**, v. 10, 2005.

WHO. **Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance** Geneva, Switzerland: World Health Organization (2014), 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>>

WHO. **GLOBAL ACTION PLAN ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE**, 2015. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf?sequence=1>

WILLIS, C. Antibiotics in the food chain: their impact on the consumer. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 153–160, 2000.

WOERTHER, P.-L.; ANDREMONT, A.; KANTELE, A. Travel-acquired ESBL-producing Enterobacteriaceae: impact of colonization at individual and community level. **Journal of travel medicine**, v. 24, n. suppl_1, p. S29–S34, abr. 2017.

WOODFORD, N. *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4793–4799, 2004.

WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 589–594, 2010.

ZAMPARETTE, C. P. Determinação fenotípica e genotípica de beta-lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *enterobacter* spp. de pacientes internados no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC). 2014.

ZINSSTAG, J. *et al.* From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. **Preventive veterinary medicine**, v. 101, n. 3–4, p. 148–156, 2011.

ZYMO RESEARCH. **DNA/RNA Shield**. Disponível em: <<https://www.zymoresearch.com/collections/dna-rna-shield>>. Acesso em: 18 jun. 2019.

10. APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE)



Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC
 Centro de Ciências da Saúde - CCS
 Centro de Ciências Biológicas - CCB
 Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC
 Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima Trindade
 CEP: 88.040-900 – Florianópolis – SC



ANEXO 1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES

Título do Projeto: Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambientes hospitalares e de criação animal.

Você está sendo convidado a participar como voluntário do trabalho de pesquisa: *Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambientes hospitalares e de criação animal*. Estamos consultando você sobre a possibilidade de utilização de *swabs* de mãos, *swabs* nasais e amostras de fezes, previamente coletados para a pesquisa de bactérias e genes de resistência antimicrobiana, frente a este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que é também um pedido de autorização para o uso de amostras biológicas neste projeto de pesquisa.

Para você decidir se gostaria de participar e autoriza o uso dessas amostras nas investigações propostas neste projeto de pesquisa, você precisa conhecer os objetivos deste projeto, os benefícios, riscos e consequências. Após receber todas as informações abaixo, você poderá fornecer o seu consentimento de participação ou não, sendo que em caso de aceite solicitaremos sua assinatura, data e local neste TCLE.

PROPÓSITO (OBJETIVOS) DO PROJETO DE PESQUISA

Devido à importância do uso de antimicrobianos (que você deve conhecer como antibióticos) na indústria animal e ao crescimento do número de microrganismos resistentes aos antibióticos (MRA) na saúde humana, neste projeto o objetivo principal é compreender o papel do ambiente hospitalar e da criação animal na ecologia da circulação de genes de resistência aos antibióticos através do estudo de genes de resistência (resistoma) empregando métodos conhecidos como metagenômica. Isso permitirá principalmente: a) compreender o papel do ambiente hospitalar e da criação animal na ecologia da circulação de resistência aos antibióticos; b) fornecer novos dados para o sistema de vigilância e análise, ampliando os locais a serem testados e fornecendo uma caracterização mais completa dos mesmos.

Para isso uma análise microbiana será realizada a partir de amostras obtidas de pacientes internados no Hospital Universitário (HU) Polydoro Ernani de São Thiago oriundos do oeste do estado de Santa Catarina, um dos seus familiares, sistemas de transporte desses indivíduos e suas casas. Em paralelo, oito granjas de suínos e oito granjas de aves de corte no oeste de Santa Catarina (representando mais de 20.000 suínos e 400.000 aves) participarão do estudo através de amostras obtidas dos albergues dos animais, do sistema de drenagem das granjas e dos cuidadores dos animais dessas granjas.

PROCEDIMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

Para o caso específico deste TCLE serão visitados pacientes em internação atual no HU provenientes do oeste de Santa Catarina para apresentar o projeto intitulado *"Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambientes hospitalares e de criação animal"*, convidando tais sujeitos a participarem como voluntários neste trabalho de pesquisa. Os sujeitos receberão todas as informações sobre este projeto. Uma vez aceita sua participação, será realizada a coleta de *swabs* e fezes em duas ocasiões: no momento da internação e na alta. Os *swabs* serão coletados a partir das narinas e do reto (somente no caso de não ser possível a coleta de fezes). Estas amostras consistem no uso de um dispositivo parecido a um cotonete que será colocado em contato com a superfície de suas narinas ou reto. Através de movimentos circulares e de ir e vir serão coletadas as amostras citadas. Adicionalmente, será solicitada também uma amostra de fezes obtida de forma espontânea em frasco específico para tal procedimento e fornecido pela equipe de pesquisa. Finalmente, uma amostra de *swab* será coletada da casa do paciente aos 3 meses da alta, sendo ela coletada do sistema de drenagem da pia da cozinha. Os procedimentos não produzirão nenhum tipo de dor, mas podem apresentar algum desconforto, e as amostras coletadas serão codificadas visando o sigilo do nome do doador das amostras. As amostras coletadas servirão para análises de caracterização dos microrganismos presentes nesses locais anatômicos, realizados através de técnicas conhecidas como metagenômica e técnicas de cultura de microrganismos conhecidas como microbiológicas. Uma amostra adicional de cada tipo e local coletado servirá para formar um biorepositório, o qual está explicitado na continuação.

BIORREPOSITÓRIO

Devido a que as técnicas a serem empregadas nas análises descritas são dispendiosas, sendo os procedimentos dessas análises constantemente melhorados pela comunidade científica, e que o projeto envolve uma logística também dispendiosa, está planejado a formação de um biorrepositório com amostras coletadas dos indivíduos participantes. Esse biorrepositório consiste num conjunto de amostras que são guardadas pelos pesquisadores com a finalidade de uso durante o presente projeto de pesquisa mas também com a possibilidade de uso em futuros projetos. Durante todo o tempo de existência do biorrepositório ele será de responsabilidade da Universidade Federal de Santa Catarina e gerenciado pelos pesquisadores responsáveis do presente projeto (citados abaixo). A assinatura do presente TCLE permitirá o uso das suas amostras para a confecção desse biorrepositório e uso das amostras durante a execução do presente projeto. Caso esse biorrepositório seja considerado para uso em projetos futuros, tais projetos deverão ser aprovados primeiro pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da UFSC e nacional (se necessário) e posteriormente, você será contatado para ser apresentado a essas novas pesquisas, decidir confirmar ou não a sua participação, e permitir ou não o uso dessas amostras já colhidas.

RISCOS

Toda pesquisa com seres humanos tem alguma possibilidade de risco. Mas, como não está previsto nenhum exame ou procedimento invasivo além dos *swabs* nasais e retais neste projeto de pesquisa, então, não estão previstos riscos imediatos com a sua participação além de, tipicamente, algum grau baixo de desconforto durante a realização do *swab* nasal e/ou retal. As amostras coletadas servirão para as análises metagenômicas e microbiológicas, as quais serão armazenadas de forma sigilosa. Porém, mesmo que mínimo, orientamos da possibilidade de risco da quebra de sigilo, mediante situação específica, o qual será evitado através do acesso restrito à base de dados e a não identificação dos pacientes nas publicações e, caso ocorra, serão tratados em termos legais, pelos pesquisadores.

CUSTOS

É necessário esclarecer que você não terá quaisquer custos ou forma de pagamento por autorizar a participação neste projeto de pesquisa e, caso isso venha a ocorrer de forma extraordinária e inesperada, você será ressarcido em termos legais, por esta pesquisadora. Se ocorrer algum prejuízo material ou imaterial decorrente da pesquisa, você poderá solicitar indenização de acordo com a legislação vigente. Ainda assim, a pesquisadora compromete-se com o cumprimento das exigências contidas nos itens IV.3 e IV.4 da referida resolução que rege esse termo. A sua participação neste projeto de pesquisa é voluntária, você deve se sentir confortável a desistir da pesquisa a qualquer momento, sem nenhum risco de prejudicar seu atendimento ou sofrer alguma penalidade ou privilégio.

SIGILO E CONFIDENCIALIDADE

A equipe da pesquisa afirma a você que serão aplicados todos os procedimentos necessários para manter o SIGILO E CONFIDENCIALIDADE dos seus dados pessoais como participante da pesquisa assim como dos resultados obtidos com a análise das suas amostras. Todas as informações deste projeto de pesquisa serão confidenciais, em nenhum momento durante o desenvolvimento desta pesquisa você será identificado (a). O seu nome não será divulgado em nenhuma circunstância. Para manter esta confidencialidade, a equipe do pesquisador responsável arquivará uma via deste TCLE assinado em sigilo absoluto.

BASES DA PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA (direito a recusa ou abandono)

É importante que você saiba que a sua participação neste projeto de pesquisa é completamente voluntária. Você pode recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo algum para você. Para isso, basta você entrar em contato com o pesquisador desse estudo, conforme nome e contatos a continuação.

DEVOLUTIVA DE RESULTADOS

Informamos que os resultados da pesquisa serão tornados públicos por meio de publicação mediante relatórios, artigos, apresentações em eventos científicos e/ou divulgação de outra natureza. Reiteramos que em todas as publicações ou divulgações, serão feitas mantendo o sigilo e a confidencialidade dos dados referentes à identificação dos participantes da pesquisa.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Você também tem todo o tempo necessário que precisar, e quiser, para ler e analisar este TCLE. A pessoa responsável por explicar e obter as assinaturas neste documento, e que lhe explicou claramente o conteúdo destas informações, também se coloca à disposição para responder todas as suas perguntas sempre que precisar e tiver novas dúvidas. Você também tem a liberdade de contatar os pesquisadores responsáveis do projeto de pesquisa toda vez que sentir necessário.

Como garantia, este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será impresso em duas vias, sendo que você ficará com posse de uma, assinada e rubricada pelos pesquisadores. Guarde sua via, pois esta lhe fornece informações de contato e garante seus direitos como participante na pesquisa. Para finalizar, declaro que toda esta pesquisa está adequada com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde sob o n° 466, de 12 de dezembro de 2012, que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

DADOS DOS PESQUISADORES RESPONSÁVEIS PELO PROJETO DE PESQUISA:

Nome completo: Thais Cristine Marques Sincero

Professora Pesquisadora, Microbiologista Celular e Molecular

Doc.de Identificação: 024.292.249-09

Endereço completo: Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade. Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde

Endereço de email: thais.sincero@ufsc.br

Telefones: (48) 3721-3474 / 999192240

Nome completo: Carlos Rodrigo Zárate Bladés

Professor Pesquisador, Imunologista Celular e Molecular

Doc.de Identificação: V294677-C / 224.653.348-16

Endereço completo: Setor F, Bloco A, Depto de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, MIP; Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade.

Endereço de email: zarate.blades@ufsc.br

Telefones: (48) 3721-5210

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) – O CEPSH é um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo, vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina, mas independente na tomada de decisões, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Você pode contatar o CEPSH no seguinte endereço: Universidade Federal de Santa Catarina Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), Horários: 10 às 12h e 16 às 18h, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401 – Trindade, Florianópolis/SC, CEP: 88.040- 400, Contato: (48) 3721-6094 cep.propesq@contato.ufsc.br

IDENTIFICAÇÃO E CONSENTIMENTO DO VOLUNTÁRIO:

Nome completo _____
 Doc. de Identificação _____

IDENTIFICAÇÃO E ASSENTIMENTO/ANUÊNCIA DE PARTICIPANTE VULNERÁVEL:

(Quando se tratar de população vulnerável)

Nome completo (ou outra manifestação para identidade) _____
 Doc. de Identificação (se for o caso) _____

IDENTIFICAÇÃO E AUTORIZAÇÃO DO RESPONSÁVEL LEGAL:

(Quando se tratar de população vulnerável)

Nome completo _____
 Doc. de Identificação _____
 Tipo de representação: _____

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO:

"Declaro que, em __/__/__, concordei em participar, na qualidade de participante do projeto de pesquisa intitulado "*Dinâmica da circulação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos entre ambientes hospitalares e de criação animal*", após estar devidamente informado sobre os objetivos, as finalidades do estudo e os termos de minha participação assino o presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias, que serão assinadas também pelo pesquisador responsável pelo projeto, sendo que uma cópia se destina a mim (participante) e a outra ao pesquisador."

"As informações fornecidas aos pesquisadores serão utilizadas na exata medida dos objetivos e finalidades do projeto de pesquisa, sendo que minha identificação será mantida em sigilo e sobre a responsabilidade dos proponentes do projeto."

"Não receberei nenhuma remuneração e não terei qualquer ônus financeiro (despesas) em função do meu consentimento espontâneo em participar do presente projeto de pesquisa."

"Declaro que estou ciente que parte das amostras coletadas servirão para a formação de um biorrepositório que ficará sob responsabilidade da UFSC e gerenciamento dos pesquisadores responsáveis da pesquisa. As amostras desse biorrepositório poderão ser empregadas para os fins do presente projeto de pesquisa e com possibilidade de serem usadas em projetos futuros. Sendo este último o caso, eu serei contatado para conhecer tais pesquisas novas e decidir ou não minha participação e uso ou não das amostras desse biorrepositório formado."

"Independentemente deste consentimento, fica assegurado meu direito a retirar-me da pesquisa em qualquer momento e por qualquer motivo, sendo que para isso comunicarei minha decisão a um dos proponentes do projeto acima citados."

Assinatura do voluntário

Assinado de forma digital por Thais
 Cristine Marques Sincero:02429224909
 Dados: 2019.08.21 14:24:05 -03'00'

Assinatura do Pesquisador (Thais Cristine Marques Sincero)

Florianópolis, _____ de _____ de 2019.

11. APÊNDICE B - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Circulação de microrganismos resistentes aos antibióticos entre ambiente hospitalar e de criação animal

Pesquisador: Thaís Cristine Marques Sincero

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 10282619.5.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.319.640

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto de pesquisa dos Professores Thaís C. M. Sincero, Carlos R. Zarate Blades e Gislaine Fongaro do Departamento de Análises Clínicas (ACL/CCS) e Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP/CCB). É um estudo prospectivo, com previsão de 440 participantes que serão submetidos a uma coleta de swabs e fezes em duas ocasiões: no momento da sua internação e na alta. Os swabs serão coletados a partir das narinas com o uso de um dispositivo parecido a um cotonete. Adicionalmente, será solicitada também uma amostra de fezes obtida de forma espontânea em frasco específico. Finalmente, uma amostra de swab será coletada de sua casa aos 3 meses da alta, sendo ela coletada do sistema de drenagem da pia da cozinha.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Compreender o papel do ambiente hospitalar e da criação animal na ecologia da circulação de genes de resistência aos antimicrobianos através do estudo do resistoma por metagenômica.

Objetivo Secundário:

1. Analisar a presença de MRA nas amostras estudadas (pacientes, familiares, agricultores e ambiente), de forma detalhada através do uso do sequenciamento por nanoporos, ferramenta de última geração para estudos de metagenômica. 2. Determinar um modelo para circulação de MRA

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.319.640

no Estado de Santa Catarina, entre granjas e hospital.3. Obter dados mais realistas sobre a contaminação ambiental por MRA de granjas e do hospital para o ambiente; 4. Colaborar com a melhora das ações para reduzir o desenvolvimento e a disseminação de MRA em Santa Catarina, com especial ênfase nos locais estudados e através dessas ações, influenciar positivamente na saúde coletiva da população do nosso Estado.5. Colaborar com a melhora da formação de recursos humanos através do uso de ferramentas genômicas de última geração e do trabalho em colaboração com diversos pesquisadores de instituições nacionais e internacionais parceiras.6. Colaborar com a inserção internacional da UFSC.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Toda pesquisa com seres humanos pode oferecer alguma possibilidade de risco. Na presente pesquisa como não está previsto nenhum exame ou procedimento invasivo além dos swabs nasais, então, não estão previstos riscos imediatos com a sua participação além de, tipicamente, algum grau baixo de desconforto durante a realização do swab nasal e/ou coleta espontânea de fezes. Além disso, o sistema de trabalho visará a codificação dos nomes dos participantes e das granjas parceiras, de forma a manter o anonimato dos dados gerados, sendo apenas possível a identificação dos mesmos através de cada indivíduo ou gerente geral da granja com os responsáveis da pesquisa, pois ao longo do estudo os participantes terão assegurado o direito de acesso aos resultados obtidos com suas amostras. Caso esses dados sejam usados para preparação de documentos científicos para participação em congressos ou eventos do tipo, assim como para divulgação científica por diversos meios, tais documentos e mídia de divulgação serão sempre preparados visando proteger o anonimato dos participantes. Entretanto, mesmo com todos os cuidados citados, mesmo que mínimo, orientamos da possibilidade de risco da quebra de sigilo, mediante situação específica, o qual será evitado através do acesso restrito à base de dados e a não identificação dos participantes e, caso ocorra, serão tratados em termos legais, pelos pesquisadores.

Benefícios:

O presente projeto não apresenta nenhum benefício direto para os participantes da pesquisa e também não existe remuneração monetária pela sua participação nem vantagem ou desvantagem durante a sua atenção no hospital no caso dos pacientes. No entanto, espera-se que caso os objetivos sejam cumpridos e o trabalho consiga entender melhor a dinâmica de circulação de MRA no estado, existirão benefícios indiretos não só para os participantes da pesquisa, mas para a

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.319.640

comunidade em geral, pois poderão ser planejadas ações que visem a redução do impacto na geração de MRA.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa pode contribuir para o conhecimento generalizável sobre o tema.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

FOLHA DE ROSTO - apresentada e assinada pelo Chefe de Departamento das Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina;

DECLARAÇÕES - Declaração da Instituição, autorizando-a nos termos da resolução 466/12 e 510 /12;

TCLE - Apresenta TCLE que atende todas as exigências da resolução 466/12;

CRONOGRAMA - Cronograma previsto para iniciar em Abril de 2019;

ORÇAMENTO - apresentado, dentro das condições para a pesquisa e financiamento próprio; ROTEIRO DE

ENTREVISTA APRESENTADO - de acordo com os objetivos da pesquisa no projeto;

Recomendações:

Atualizar cronograma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1313725.pdf	24/03/2019 22:09:00		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_MINION_1_Anexo_3_Cuidadores.pdf	24/03/2019 22:08:31	Thais Cristine Marques Sincero	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_MINION_1_Anexo_2_Parente.pdf	24/03/2019 22:05:42	Thais Cristine Marques Sincero	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_MINION_1_Anexo_1_Pacientes.pdf	24/03/2019 22:05:34	Thais Cristine Marques Sincero	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.319.640

Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoHU.pdf	18/03/2019 10:14:39	Thais Cristine Marques Sincero	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	18/03/2019 10:14:04	Thais Cristine Marques Sincero	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.pdf	15/03/2019 15:57:54	Thais Cristine Marques Sincero	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 10 de Maio de 2019

Assinado por:
Nelson Canzian da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

12. APÊNDICE C- Scores obtidos para cada isolado na identificação MALDI-ToF

Tipo de amostra	Microrganismo identificado	Score
Transporte	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.22
Transporte	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	2.15
Transporte	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	2.22
Transporte	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.95
Transporte	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.81
Transporte	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.13
Transporte	<i>Cronobacter sp.</i>	1.90
Transporte	<i>Franconibacter pulveris</i>	2.31
Transporte	<i>Cronobacter sp.</i>	2.19
Transporte	<i>Franconibacter pulveris</i>	2.15
Transporte	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	2.46
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	1.95
Paciente	<i>Proteus mirabilis</i>	2.32
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.22
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	1.97
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.19
Paciente	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.21
Paciente	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.17
Paciente	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.95
Paciente	<i>Morganella morganii</i>	2.56
Paciente	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.14
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.42
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.37
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.20
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.11
Paciente	<i>Morganella morganii</i>	2.43
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.12
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.31
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.24
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.49
Paciente	<i>Hafnia alvei</i>	2.26
Paciente	<i>Hafnia alvei</i>	2.22
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.15
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.12
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.25
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.32
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.22
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.30

Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.33
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.49
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.42
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.46
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.21
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.25
Paciente	<i>Providencia stuartii</i>	2.39
Paciente	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.14
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.43
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.36
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.44
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.36
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.36
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.11
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.36
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.36
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.28
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.42
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.26
Paciente	<i>Klebsiella aerogenes</i>	2.42
Paciente	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.34
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.39
Paciente	<i>Enterobacter cloacae</i>	1.82
Paciente	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.24
Paciente	<i>Citrobacter freundii</i>	2.21
Paciente	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.32
Paciente	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.22
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.41
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.37
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.44
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.28
Paciente	<i>Citrobacter sedlakii</i>	2.33
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.53
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.49
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.33
Paciente	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.03
Paciente	<i>Citrobacter braakii</i>	2.34
Paciente	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.19
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.39
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.36
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.08
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.18
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.34
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.30
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.37
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.36

Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.44
Paciente	<i>Escherichia coli</i>	2.51
Granja aves	<i>Escherichia coli</i>	2.30
Granja aves	<i>Escherichia coli</i>	2.33
Granja aves	<i>Escherichia coli</i>	2.09
Granja aves	<i>Escherichia coli</i>	2.24
Granja suínos	<i>Alcaligenes faecalis</i>	2.13
Granja suínos	<i>Escherichia coli</i>	2.40
Granja suínos	<i>Escherichia coli</i>	2.32
Granja suínos	<i>Escherichia coli</i>	2.31
Granja suínos	<i>Morganella morganii</i>	2.42
Granja suínos	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1.97
Granja suínos	<i>Escherichia coli</i>	2.10
Granja suínos	<i>Proteus penneri</i>	2.05
Granja suínos	<i>Proteus mirabilis</i>	2.29
Granja suínos	<i>Proteus mirabilis</i>	2.33
Granja suínos	<i>Proteus mirabilis</i>	2.22
Granja suínos	<i>Escherichia coli</i>	2.02
Granja suínos	<i>Escherichia coli</i>	2.33
Granja orgânicos	<i>Proteus mirabilis</i>	2.15
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.24
Granja orgânicos	<i>Acinetobacter gernerii</i>	1.74
Granja orgânicos	<i>Proteus mirabilis</i>	2.19
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.27
Granja orgânicos	<i>Proteus hauseri</i>	2.35
Granja orgânicos	<i>Morganella morganii</i>	2.40
Granja orgânicos	<i>Proteus hauseri</i>	2.14
Granja orgânicos	<i>Proteus hauseri</i>	2.11
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.03
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.24
Granja orgânicos	<i>Sem identificação</i>	-
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.29
Granja orgânicos	<i>Morganella morganii</i>	2.36
Granja orgânicos	<i>Proteus mirabilis</i>	2.06
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.06
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.05
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.23
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.21
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.31
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.13
Granja orgânicos	<i>Sem identificação</i>	-
Granja orgânicos	<i>Morganella morganii</i>	2.42
Granja orgânicos	<i>Proteus penneri</i>	1.97
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.26
Granja orgânicos	<i>Providencia rettgeri</i>	1.90

Granja orgânicos	<i>Morganella morganii</i>	2.28
Granja orgânicos	<i>Proteus mirabilis</i>	2.17
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.16
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.30
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.17
Granja orgânicos	<i>Proteus hauseri</i>	2.34
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.25
Granja orgânicos	<i>Proteus hauseri</i>	2.44
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.11
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.28
Granja orgânicos	<i>Proteus vulgaris</i>	2.03
Granja orgânicos	<i>Proteus vulgaris</i>	1.98
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.08
Granja orgânicos	<i>Proteus hauseri</i>	1.90
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.3
Granja aves	<i>Escherichia coli</i>	2.29
Granja suínos	<i>Proteus mirabilis</i>	2.23
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.03
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.40
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	1.93
Granja orgânicos	<i>Escherichia coli</i>	2.37
Paciente	<i>Citrobacter braakii</i>	2.42
Paciente	<i>Citrobacter braakii</i>	2.27
Granja aves	<i>Pseudomonas monteilii</i>	1.98
Granja aves	<i>Pseudomonas monteilii</i>	2.07
Granja aves	<i>Pseudomonas monteilii</i>	2.25
Granja suínos	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1.95
Granja suínos	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1.82
Granja suínos	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1.88
Granja suínos	Sem identificação	-
Granja suínos	<i>Acinetobacter sp.</i>	2.03
Granja orgânicos	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1.90
Granja orgânicos	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	2.36
Granja orgânicos	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	2.53
Granja orgânicos	<i>Pseudomonas monteilii</i>	2.3
Granja orgânicos	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	1.96
Granja orgânicos	Sem identificação	-
Granja orgânicos	<i>Pseudomonas guariconensis</i>	2.35
Granja aves	<i>Pseudomonas monteilii</i>	2.14
Granja aves	<i>Pseudomonas monteilii</i>	2.00
Granja aves	<i>Pseudomonas monteilii</i>	1.81
Granja aves	<i>Pseudomonas monteilii</i>	1.86
Granja orgânicos	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1.91
Granja orgânicos	<i>Burkholderia cepacia</i>	2.20

3. ANEXO D Perfil de Sensibilidade Antimicrobiana de Colônias Gram Negativas fermentadoras

Origem	NOME COLÔNIAS	FENICÓIS				GLICOPÉPTIDOS						CARBAPENÊMS			IMIPENÊMS	FLUOROQUINOLÓNICOS			AMINOGLICOSÍDIOS			TETRACICLÍNICOS	AGLUCOSÍDIOS		
		Ampicilina 10µg	Ampicilina + Sulbactam 10/10µg	Amoxicilina + Ácido Clavulânico 20/10µg	Piperacilina + tazobactam 30/6µg	Cefepime 30µg	Cefotaxime 5µg	Cefoxitina 30µg	Ceftazidima 10µg	Ceftriaxona 30µg	Cefuroxime 30µg	Ertapenem 10µg	Imipenem 10µg	Meropenem 10µg	Aztreonam 30µg	Ciprofloxacina 5µg	Levofloxacina 5µg	Norfloxacina 10µg	Amicacina 30µg	Gentamicina 10µg	Tobramicina 10µg	Tigeciclina 15µg	Fosfomicina 200µg	Nitrofurantoina 100µg	Sulfametoxazol + Trimetoprim 23,75/1,25 µg
Transporte	TSM0 1 A	R	S	R	S	I	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Transporte	TSM0 1 C	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	
Transporte	TSM0 1 B	R	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Transporte	TCON 1 D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Transporte	TCON 2 D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Transporte	TCON 3 D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Transporte	TER 1 B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Transporte	TER 2 B	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	
Transporte	TER 1 C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Transporte	TER 2 C	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	
Transporte	TVI 1 C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	
Paciente	1ir A1	R	S	S	I	I	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	
Paciente	1ir A3 (II)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	
Paciente	1ir C1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	
Paciente	2if A1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Paciente	2if A2.1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	
Paciente	2if A2.2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	
Paciente	2if B1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	
Paciente	2if C1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	
Paciente	3if A1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	
Paciente	3if A2	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	
Paciente	3if A3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	
Paciente	3if A4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Paciente	3if B1	R	S	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Paciente	3if B2	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Paciente	3if C1 (II)	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Paciente	3if C2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Paciente	3if C3	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	
Paciente	4ir A1	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Paciente	4ir A2	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	
Paciente	4ir C1	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	
Paciente	4ir C2	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Paciente	4ar A1	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S	R	
Paciente	4ar A2	R	S	S	S	R	I	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Paciente	4ar C1	R	R	R	I	R	R	S	S	I	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	
Paciente	5if C1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Paciente	5if C2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	
Paciente	6if B1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	
Paciente	6if C1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	
Paciente	6if C2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Paciente	7ir A1	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	

Paciente	7ir A2	R	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R
Paciente	7ir A3	R	S	S	S	R	R	S	I	R	R	S	S	S	I	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R
Paciente	7ir B1	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
Paciente	7ir C1	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R
Paciente	7ar A1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
Paciente	7ar A2	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R
Paciente	7ar A3	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R
Paciente	7ar B1	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R
Paciente	7ar B2	R	S	S	S	I	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R
Paciente	7ar C1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	8if A1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	8if A2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	8if B1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	8if C1	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	S	I	I	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S
Paciente	8if C2	S	S	R	S	R	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
Paciente	8af A1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	8af A2	S	S	R	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Paciente	8af A3	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Paciente	8af B1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	8af B2	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	8af B3	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	8af C1	S	S	R	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	8af C2	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	8af C3	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Paciente	9ir A	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
Paciente	9ir B	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
Paciente	9ir C1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
Paciente	9ir C2	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
Paciente	9ar A1	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Paciente	9ar A2	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	I	S	S	S	R	R	S	S	R	R
Paciente	9ar C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R
Paciente	10if A1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
Paciente	10if A2	S	S	R	S	I	R	R	I	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
Paciente	10if A3	S	S	S	I	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	10if B1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
Paciente	10if B2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	10if C1	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
Paciente	10if C2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	10al B2	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
Paciente	11if A1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	12ir B	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	12ir C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Paciente	13ar A	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Paciente	13ar C	R	R	S	S	R	R	S	I	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Paciente	14ir A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Granja	GA.I.1.C1.A1	R	R	R	S	I	R	R	I	I	R	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
Granja	GA.I.1.C1.B1	R	R	R	S	R	R	R	I	S	R	R	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
Granja	GA.I.3.C1.A1	R	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
Granja	GA.I.3.C1.B1	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R
Granja	GA.II.1.C1.A1	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R
Granja	GA.II.1.C1.C1	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R
Granja	GA.II.3.C1.A1	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
Granja	GA.II.3.C1.A2	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R
Granja	GS.I.1.C1.C1	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
Granja	GS.I.3.C1.A1	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R
Granja	GS.I.3.C1.A2	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R

Granja	GS.I.3.C1.C1	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	
Granja	GS.I.3.C1.C2	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	
Granja	GS.I.3.C1.C3	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	I	R	S	R	R	S	R	R	R	
Granja	GS.II.1.C1.B1	R	S	R	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	
Granja	GS.II.2.C1.A1	R	S	S	S	R	R	S	I	R	R	S	S	S	I	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	
Granja	GS.III.1.C1.B1	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	
Granja	GS.III.2.C1.A1	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	
Granja	GS.III.2.C1.B1	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	R	R	
Granja	GS.III.2.C1.C1	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	I	I	S	S	S	S	R	S	S	R	R	
Granja	GS.III.2.C1.C2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	
Granja	GS.III.3.C1.A1	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	
Granja	SGO.1.1.A1	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R
Granja	SGO.1.1.A2	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	
Granja	SGO.1.1.B2	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	
Granja	SGO.1.1.C1	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	
Granja	SGO.1.1.C2	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	
Granja	SGO.1.2.A2	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	
Granja	SGO.1.2.B1	R	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	
Granja	SGO.1.2.B3	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R
Granja	SGO.1.2.C1	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S	S	R	I	R	S	S	R	S	R	R	R	R	
Granja	SGO.1.2.C2	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
Granja	SGO.1.2.C3	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	
Granja	SGO.2.1.A2	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	I	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	
Granja	SGO.2.1.A3	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Granja	SGO.2.1.B	R	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	I	R	S	S	R	S	R	R	R	
Granja	SGO.2.1.C1	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Granja	SGO.2.1.C2	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
Granja	SGO.2.2.A1	R	R	R	S	S	R	R	S	I	R	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	
Granja	SGO.2.2.A2	R	S	S	S	R	R	S	I	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	
Granja	SGO.2.2.B2	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	
Granja	SGO.2.2.C1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Granja	SGO.2.2.C3	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
Granja	SGO.3.1.A	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S
Granja	SGO.3.2.A2	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	
Granja	SGO.3.2.B	R	R	R	I	I	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R
Granja	SGO.3.2.C2	R	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	R	S	R	
Granja	SGO.4.1.B	R	R	R	S	S	I	R	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	
Granja	SGO.4.2.A1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	
Granja	SGO.4.2.A2	R	R	R	S	I	R	S	I	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Granja	SGO.4.2.B1	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	
Granja	SGO.4.2.C1	R	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	I	R	S	S	R	S	R	S	R	
Granja	SGO.4.2.C2	R	S	R	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	
Granja	SGO.4.2.C3	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	
Granja	SGO.5.1.A1	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	
Granja	SGO.5.1.A2	R	S	R	S	R	R	S	I	R	R	S	S	I	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	
Granja	SGO.5.1.B1	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	
Granja	SGO.5.1.B2	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	
Granja	SGO.5.1.C1	R	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	
Granja	SGO.5.1.C2	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Granja	SGO.5.2.A2	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	
Granja	SGO.5.2.B1	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
Granja	SGO.5.2.B2	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Granja	SGO.5.2.B3	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	
Granja	SGO.5.2.C1	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
Granja	SGO.5.2.C2	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	
Granja	GA.II.3.C1.D3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S

Granja	GS.III.2.C1.D3	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S
Granja	SGO.1.1.D1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
Granja	SGO.2.1.D.2	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R

20		SABA
1		RESERVA
-		RUBEN TRAU

14 ANEXO Perfil de Sensibilidade para as amostras de bovinos Gamagrão, conforme metodologia do BOAST.

Origem	NOME COLÔNIAS	MICROORGANISMO	Penicilinas	Cefalosporinas		Carbapenênicos		Minciclina	Fluoroquinolonas		Aminoglicosídeos			Amisinas
			Piperacilina + tazobactam 30/6µg	Cefotaxime 5µg	Cefepime 30µg	Meropenem 10µg	Imipenem 10µg	Aztreonam 30µg	Levofloxacina 5µg	Ciprofloxacina 5µg	Tobramicina 10µg	Amicacina 30µg	Gentamicina 10µg	Sulfametoxazol + Trimetoprim
Garça	GACBI	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	-	R	-	-	-	-	S	S	-	-
Garça	GACBI	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	-	R	-	-	-	-	S	S	-	-
Garça	GACAI	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	-	R	-	-	-	-	S	S	-	-
Garça	GACBI	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	-	R	-	-	-	-	S	S	-	-
Garça	SG2AI	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	-	R	-	R	-	-	S	S	-	-
Garça	GACBI	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	-	R	-	-	-	-	S	S	-	-
Garça	GACAI	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	-	R	-	-	-	-	S	S	-	-
Garça	SG2AI	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	R	R	-	-	R	-	S	S	-	-
Garça	GACAI	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	-	R	-	-	-	-	S	S	-	-
Garça	SG2BI	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	-	R	-	R	-	-	S	S	-	-
Garça	SG2AI	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	-	-	S	-	-	R	-	S	S	-	-
Garça	SG1BI	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	R
Garça	GACAI	<i>Aerobacter sp.</i>	-	-	-	S	S	-	S	R	-	-	S	R

S	Sensível
R	Resistente
S/R	Variação de sensibilidade
-	Não se aplicável