



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

TAILA DOS SANTOS ALVES

DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS
EM *Escherichia coli* DE ORIGEM ANIMAL E O EFEITO NA
DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA NO AMBIENTE –
PESQUISA EM CEPAS COMENSAIS E PRODUTORAS DE
TOXINA SHIGA

CAMPINAS

2023

TAILA DOS SANTOS ALVES

**DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM
Escherichia coli DE ORIGEM ANIMAL E O EFEITO NA
DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA NO AMBIENTE – PESQUISA EM
CEPAS COMENSAIS E PRODUTORAS DE TOXINA SHIGA**

*Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de
Doutora em Biologia Animal na área
de Relações Antrópicas, Meio
Ambiente e Parasitologia.*

Orientador: Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA TAILA DOS SANTOS ALVES E
ORIENTADA PELO DR. DOMINGOS DA SILVA
LEITE.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

AL87d Alves, Taila dos Santos, 1988-
Determinação da resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli* de origem animal e o efeito na disseminação da resistência no ambiente - pesquisa em cepas comensais e produtoras de toxina shiga / Taila dos Santos Alves. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Domingos da Silva Leite.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Integrons. 2. Mosca. 3. Bovino de leite. 4. Plasmídeos. I. Leite, Domingos da Silva, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Determination of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from animals and the effect on the dissemination of resistance in the environment - research on commensal and shiga toxin-producing strains

Palavras-chave em inglês:

Integrons

Flies

Dairy cattle

Plasmids

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Doutora em Biologia Animal

Banca examinadora:

Domingos da Silva Leite [Orientador]

Monique Ribeiro Tiba Casas

Márcio André Miranda

Rogério Ferreira Lourenço

Cristina Elisa Alvarez Martinez

Data de defesa: 21-11-2023

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5672-509X>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/8274733520552177>

Campinas, 21 de novembro de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Profa. Dra. Monique Ribeiro Tiba Casas

Prof. Dr. Márcio André Miranda

Prof. Dr. Rogério Ferreira Lourenço

Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez Martinez

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Animal da Unidade Instituto de Biologia.

Aos meus ancestrais.

À minha mãe por todo amor, fé e apoio sempre.

Agradecimentos

Aos meus pais que tanto se esforçaram para me oferecer a melhor criação dentro das possibilidades.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, por todos os ensinamentos, oportunidades, incentivo, confiança, apoio, carinho e presença. Obrigada por me acompanhar durante todos esses anos e enriquecer meu aprendizado não somente sobre a profissão, mas também sobre a vida.

Ao Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro e ao Dr. Gustavo Henrique Batista Lara pelo auxílio na obtenção das amostras, disposição e por todas as orientações.

À bióloga Ma. Mirtis Maria Giaciani Ferraz pelo auxílio e ensinamentos.

À técnica Bianca Cristina Zupirulli pelo auxílio, apoio e amizade.

À Profa. Dra. Amanda Keller Siqueira pelo incentivo, disposição, ajuda e ensinamentos.

Aos membros da banca do Exame de Qualificação, Profa. Dra. Fabiana, Profa. Dra. Selma Giorgio e Prof. Dr. Rogério Ferreira Lourenço pela participação e sugestões.

Às Dras. Monique Ribeiro Tiba Casas, Cristina Elisa Alvarez Martinez, Raquel Fernanda Salla Jacob e aos Drs. Márcio André Miranda, Marcelo Brocchi, Rogério Ferreira Lourenço e Lucas de Moraes Ceseti por terem aceitado o convite para participar da banca de defesa.

À Taís Baruel Vieira, Vinícius Sanches Rosa, Marina Rodrigues Pinto Garcia, Thiely Martins Breschiani e Guilherme Borelli por toda a ajuda, colaboração e amizade.

À Luisa de Pontes Ribeiro, Tamile Carvalho, Carolina Lambertini e Ariane Campos pela amizade, companheirismo e ajuda.

Às minhas irmãs de jornada Tainara Fortes da Silveira, Micheline Araújo, Angela Farah, Geisa Vargas, Camila Cattani e ao Henrique Toni por todo suporte e curas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), auxílios número 2015/15425-2 e 2015/19688-8.

RESUMO

A utilização de antimicrobianos na produção animal – uso terapêutico, profilático e como promotor do crescimento, além da aplicação de esterco como fertilizante, permitem que as fazendas sejam consideradas como uma das fontes ambientais de resistência antimicrobiana. Isto se deve tanto à pressão seletiva gerada pelos resíduos de antimicrobianos quanto à disponibilização no ambiente de cepas resistentes e genes. No contexto da produção animal, como a bovinocultura, a microbiota intestinal dos animais é constantemente alvo da seleção exercida pelos antimicrobianos, de modo que cepas comensais podem atuar como reservatórios de genes de resistência e transferi-los às cepas patogênicas. *Escherichia coli* possui representantes comensais e patogênicos de modo que o estudo da mobilização de genes na espécie se torna possível. Adicionalmente, bovinos são reservatórios de *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) e a presença destas cepas no ambiente de ordenha confere riscos à saúde da população humana em contato com os animais. Diante da possibilidade de transferência de genes entre cepas comensais e patogênicas dentro do hospedeiro e veiculação no ambiente, este estudo buscou: i: demonstrar a disseminação da resistência em *E. coli* isoladas de animais domésticos (vacas, bezerros, cães, entre outros), dípteros muscoides conviventes em duas propriedades leiteiras da região de Botucatu, SP e fontes de água, por meio da caracterização dos determinantes de resistência genéticos; ii: caracterizar os fatores de virulência associados à patogenicidade nas STEC; iii: caracterizar plasmídeos e integrons e realizar ensaios de conjugação a fim de avaliar a capacidade de disseminação dos genes de resistência entre as bactérias isoladas de animais e as fontes de água das propriedades e, iv: avaliar o perfil clonal das cepas. Não houve associação entre o período de coleta e a frequência de resistência aos antimicrobianos testados. Foi encontrada alta frequência de resistência a polimixina (41,7%) e o gene *mcr-1.1* mobilizado pelo plasmídeo IncX4 e IS26. As STEC apresentaram baixa frequência de multirresistência e diversidade de perfis genômicos pela técnica de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*. Os integrons presentes nas cepas isoladas de moscas e bezerros da Propriedade A não foram associados a plasmídeos e apresentaram o gene *dfrA7* como cassete gênico e os genes *bla_{CTX-M-2}* associados ao mesmo transposon (integron complexo). As cepas de bezerros da Propriedade B apresentaram o gene *aadA1* como cassete gênico do integron presente em um fago-plasmídeo p0111. A análise filogenética demonstrou a veiculação de cepas- clones positivas para integron e/ou multirresistente entre mosca e bezerro (ST224) e entre mosca e cão (ST58). Os resultados sugerem a veiculação de cepas resistentes pela superfície externa de moscas e a circulação e disseminação de determinantes de resistência entre cepas de diferentes perfis e oriundas de diferentes animais da fazenda. Os isolados de moscas podem constituir uma ferramenta importante para monitoramento e controle de disseminação, dada a semelhança com as cepas provenientes da microbiota intestinal dos animais de fazenda.

Palavras-chave: integron, plasmídeos, STEC, bovinos leiteiros, moscas, *dfrA7*, *mcr-1.1*, *aadA1*.

ABSTRACT

The antimicrobial uses in animal husbandry – therapeutic, prophylactic, and growth-promoting use, as well as applying manure as fertilizer, placed farms as one of the environmental sources of antimicrobial resistance. These practices promote the selective pressure driven by antimicrobial residues and the availability of resistant strains and genes in the environment. In animal production, such as cattle farming, the intestinal microbiota of animals is constantly the target of selection driven by antimicrobials. Commensal strains can act as reservoirs of resistance genes and transfer them to pathogenic strains. *Escherichia coli* has commensal and pathogenic strains. Therefore, the study of gene mobilization is possible. Additionally, cattle are reservoirs of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), and their isolation in the milking environment is a concern to health risks to the human population in contact with the animals. Given the possibility of gene transfer between commensal and pathogenic strains within the host and dissemination in the environment, this study aimed: i: demonstrate the spread of resistance in *E. coli* isolated from domestic animals (cows, calves, dogs, and others), muscoid dipterans cohabitant on two dairy properties in the Botucatu, SP area, and water sources, through antimicrobial resistance determinants characterization; ii: characterize the virulence factors associated with pathogenicity in STEC; iii: characterize plasmids and integrons and carry out conjugation assays to evaluate spread of antimicrobial resistance genes between strains from animals and between the water's sources on properties and, iv: evaluate the clonal profile of the strains. There was no association between the collection period and the frequency of resistance to the antimicrobials tested. A high frequency of resistance to polymyxin (41.7%) and the *mcr-1.1* gene mobilized by the IncX4 and IS26 plasmids were found. STEC showed a low frequency of multiresistance and diversity of genomic profiles by the Pulsed-Field Gel Electrophoresis approach. The integrons from fly strains and calf strains from farm A were not associated with plasmids and showed the *dfrA7* gene as a gene cassette and the *bla_{CTX M-2}* gene associated with the same transposon (integron complex). The calf strains from farm B showed the *aadA1* gene as an integron gene cassette integrated into a phage-like plasmid p0111. Phylogenetic analysis demonstrated the transmission of integron-positive and/or multidrug-resistant clone strains between fly and calf (ST224) and between fly and dog (ST58). The results suggest the spread of resistant strains through the external surface of flies and the circulation and dissemination of resistance determinants between strains with different profiles and isolated from distinct animals cohabitant on farms. Fly isolates can constitute an important tool for monitoring and controlling antimicrobial resistance spread given their similarity to strains from the intestinal microbiota of farm animals.

Keywords: integron, plasmids, STEC, dairy cows, flies, *dfrA7*, *mcr-1.1*, *aadA1*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema dos principais patotipos de <i>Escherichia coli</i> patogênica intestinal ou diarreicogênica.....	21
Figura 2. Esquema dos mecanismos de resistência à polimixina mediados por mutações no cromossomo de bactérias Gram-negativas..	29
Figura 3. Estrutura típica do integron. Em integrons de classe 1, a expressão da integrase é induzida pela resposta SOS da bactéria.....	33
Figura 4. Localização dos pontos de coleta.....	41
Figura 5. Frequência relativa da resistência aos antimicrobianos de <i>E. coli</i> isoladas da superfície externa de moscas coletadas na propriedade A nos períodos de inverno e verão (Botucatu-SP, 2019)	58
Figura 6. Frequência relativa da resistência aos antimicrobianos de <i>E. coli</i> isoladas de amostras de água coletadas na propriedade A nos períodos de inverno e verão (Botucatu-SP, 2019).....	58
Figura 7. Teste de aproximação de disco para duas cepas de <i>Escherichia coli</i>	59
Figura 8. Teste de aproximação de disco de amostra de <i>E. coli</i> antes e após ensaio de conjugação.....	64
Figura 9. Proporção de <i>Escherichia coli</i> resistente à polimixina por animal e propriedade (Botucatu – SP, 2015).....	67
Figura 10. Perfil clonal de <i>Escherichia coli</i> positivas para <i>mcr-1</i> isoladas de bezerros da propriedade B (Botucatu – SP, 2015).....	68
Figura 11. Mapa circular do plasmídeo IncX4 com 31.966 pb albergando <i>mcr-1.1</i> gene da cepa BB6d e comparação com dois plasmídeos IncX4 <i>mcr-1.1</i> positivo de referência (GenBank CP015977 e MF175184)..	70
Figura 12. Representação esquemática do integron de classe 1 circularizado pela IS26 encontrado na cepa BB6d portadora do gene <i>mcr-1.1</i>	71
Figura 13. Ensaio de citotoxicidade em células Vero..	73

Figura 14. Teste de aglutinação do antígeno “O”	74
Figura 15. Perfil clonal de STECs multirresistentes a antimicrobianos isoladas de fezes de bezerros, superfície externa de moscas e de amostras de água (Botucatu – SP, 2015; 2019)..	83
Figura 16. Frequência fenotípica relativa da resistência a antimicrobianos em <i>Escherichia coli</i> isoladas da superfície externa de dípteros muscoides e fezes de bezerros, vacas, mulas, éguas e cães da Propriedade A (Botucatu- SP, 2015).....	84
Figura 17. Frequência da resistência fenotípica a antimicrobianos entre os animais coabitantes na Propriedade A (moscas, bezerros, vacas, mulas, éguas e cães). Diferença entre as médias dos postos. Teste Kruskal-Wallis e <i>post hoc</i> de Dunn com significância $p < 0,05$. Botucatu-SP, 2015.....	85
Figura 18. Frequência fenotípica relativa da resistência a antimicrobianos em <i>Escherichia coli</i> isoladas da superfície externa de dípteros muscoides e fezes de bezerros, carneiro e cordeiros da Propriedade B (Botucatu- SP, 2015).....	86
Figura 19. Frequência da resistência fenotípica a antimicrobianos entre os animais coabitantes na Propriedade B (moscas, bezerros, vacas, cordeiros e carneiro). Diferença entre as médias dos postos. Teste Kruskal-Wallis e <i>post hoc</i> de Dunn com significância $p < 0,05$. Botucatu-SP, 2015.....	86
Figura 20. Agrupamento hierárquico e <i>heatmap</i> da resistência fenotípica aos antimicrobianos testados em <i>Escherichia coli</i> isoladas da superfície externa de moscas e fezes de bezerros (Botucatu-SP, 2015; 2019)..	87
Figura 21. Dendrograma obtido pela técnica de PFGE a partir da digestão enzimática com XbaI do DNA cromossômico de <i>E. coli</i> positivas para integron de classe 1 isoladas de moscas e bezerros coabitantes em propriedades leiteiras da região de Botucatu, SP (2015).....	89
Figura 22. Dendrograma obtido pela técnica de PFGE a partir da digestão enzimática com XbaI do DNA cromossômico de <i>E. coli</i> positivas para integron de classe 1 isoladas dípteros muscoides e bezerros da Propriedade A (Botucatu-SP, 2015; 2019).....	91

Figura 23. Agrupamento hierárquico e <i>heatmap</i> do viruloma de <i>Escherichia coli</i> isoladas da superfície externa de moscas e fezes de e cão coabitantes em duas propriedades leiteiras (Botucatu -SP, 2015).	94
Figura 24. Agrupamento hierárquico e <i>heatmap</i> do viruloma de <i>Escherichia coli</i> isoladas da superfície externa de moscas e fezes de e cão coabitantes em duas propriedades leiteiras (Botucatu -SP, 2015)	95
Figura 25. Agrupamento hierárquico e <i>heatmap</i> dos plasmídeos (Inc/replicon) de <i>Escherichia coli</i> isoladas da superfície externa de moscas e fezes de e cão coabitantes em duas propriedades leiteiras (Botucatu -SP, 2015).	96
Figura 26. Integron de classe 1 circulante em <i>Escherichia coli</i> isoladas da superfície externa de dípteros muscoides e fezes de bezerros na Propriedade A..	101
Figura 27. Alinhamento das sequências de integron de classe 1 encontradas nas cepas de mosca (MA17a) e bezerro (BA15d) com o plasmídeo referência CP031284.1	102
Figura 28. Integron de classe 1 em <i>Escherichia coli</i> isoladas de fezes de bezerros na Propriedade B..	103
Figura 29. Alinhamento do plasmídeo p0111 presente nas cepas BB1d e BB8c portador de integron de classe 1 com os plasmídeos AP010962.1 e AP027192.1.....	104
Figura 30. Árvore filogenética de <i>Escherichia coli</i> positiva para integron de classe 1 e/ou multirresistente a antimicrobianos isoladas da superfície externa de dípteros muscoides, fezes de bezerros e cão em duas propriedades leiteiras inferida por máxima verossimilhança com base no genoma central (cgMLST, 1000 genes) (Botucatu -SP, 2015).	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas no estudo. Animais amostrados em duas propriedades leiteiras de Botucatu, SP (2015).....	40
Tabela 2. Iniciadores utilizados para a detecção dos fatores de virulência, genes de resistência e integrons.	44
Tabela 3. Conjunto dos antissoros anti-O de <i>E. coli</i> utilizados nos ensaios de aglutinação. ..	49
Tabela 4. Conjunto dos antissoros anti-H de <i>E. coli</i> utilizados nos ensaios de aglutinação. ..	51
Tabela 5. Frequência relativa de <i>Escherichia coli</i> resistentes* isoladas de fezes de bovinos, caninos, equinos e ovinos em duas propriedades leiteiras da região de Botucatu, SP (2015). ..	57
Tabela 6. Resistência antimicrobiana, filogrupos, tipagem plasmidial, conjugação e biofilme de <i>Escherichia coli</i> positivas para integron isoladas de bezerros em duas propriedades leiteiras de Botucatu, SP (2015).....	62
Tabela 7. Resistência antimicrobiana, filogrupos, tipagem plasmidial, conjugação de <i>Escherichia coli</i> positivas para integron isoladas de bezerros e moscas da Propriedade A nos períodos de inverno e verão (Botucatu – SP, 2019).	63
Tabela 8. Resultado do ensaio de conjugação para as cepas das Propriedades A e B. Comparação do perfil de resistência fenotípico e genotípico entre as cepas doadoras e transconjugantes.	65
Tabela 9. Resultado do ensaio de conjugação para as cepas da Propriedade A coletadas no inverno e verão. Comparação do perfil de resistência fenotípico entre as cepas doadoras e transconjugantes.	66
Tabela 10. <i>Escherichia coli</i> positivas para <i>mcr-1</i> isoladas de bezerros da propriedade B (Botucatu – SP, 2015). Concentração inibitória mínima (CIM), grupos filogenéticos e perfil plasmidial.	68
Tabela 11. Cepas de <i>Escherichia coli</i> (STEC) selecionadas para sorotipagem isoladas de bezerros, cordeiros, carneiro e superfície externa de moscas das Propriedades A e B (Botucatu – SP, 2015). Sensibilidade antimicrobiana e fatores de virulência.	75

Tabela 12. Sorotipos e genes <i>stx</i> e <i>eae</i> associados em <i>Escherichia coli</i> isoladas de bezerros, cordeiros e carneiro das Propriedades A e B (Botucatu – SP, 2015).	78
Tabela 13. Cepas de <i>Escherichia coli</i> (STEC) isoladas de bezerros, água e superfície externa de moscas na Propriedade A nos períodos de inverno e verão (Botucatu – SP, 2019). Sensibilidade antimicrobiana, fatores de virulência e grupos filogenéticos.....	81
Tabela 14. <i>Escherichia coli</i> positivas para integron de classe 1 isoladas de dípteros muscoides na Propriedade A (Botucatu – SP, 2015). Resistoma, viruloma, sequências tipo (ST), sorotipagem e plasmídeos.....	97
Tabela 15. <i>Escherichia coli</i> positivas para integron de classe 1 isoladas de bezerros e multirresistente a antimicrobianos isolada de cão na Propriedade A (Botucatu – SP, 2015). Resistoma, viruloma, sequências tipo (ST), sorotipagem e plasmídeos.....	98
Tabela 16. <i>Escherichia coli</i> positivas para integron de classe 1 isoladas de bezerros na Propriedade B (Botucatu – SP, 2015). Resistoma, viruloma, sequências tipo (ST), sorotipagem e plasmídeos.....	99

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO	16
1.1. <i>Escherichia coli</i>	17
1.1.1. Comensais versus patógenos	17
1.1.2. <i>Escherichia coli</i> patogênicas	19
1.1.3. <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC)	24
1.2. Resistência a antimicrobianos	26
1.3. Disseminação da resistência a antimicrobianos	30
1.3.1. Mecanismos moleculares da disseminação	32
1.3.2. Propriedades leiteiras no contexto da resistência a antimicrobianos	34
II – OBJETIVOS	37
2.1. Objetivo geral	38
2.1.1. Objetivos específicos	38
III - MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Amostras	40
3.1.1. Amostragem inicial	40
3.1.2. Amostras posteriores	40
3.1.3. Coleta de amostras, isolamento e identificação de <i>E. coli</i>	41
3.2. Caracterização da resistência a antimicrobianos	42
3.2.1. Sensibilidade a antimicrobianos (antibiograma)	42
3.2.2. Produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) – Método da aproximação de disco	43
3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	43
3.3.1. Extração de DNA (método de choque térmico)	43
3.3.2. PCR	43
3.4. Pesquisa da resistência a polimixina	45
3.4.1. Triagem de <i>E. coli</i> resistentes a polimixina	45
3.4.2. Detecção dos genes <i>mcr</i>	45
3.4.3. Sequenciamento <i>Sanger</i>	45
3.4.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	45
3.5. Caracterização dos integrons	46
3.6. Caracterização dos plasmídeos e conjugação	46
3.6.1. Perfil plasmidial por <i>PCR-Based Replicon Typing</i> (PBRT)	46
3.6.2. Ensaio de conjugação	46

3.7. Pesquisas relacionadas à virulência	47
3.7.1. Classificação filogenética de <i>E. coli</i>	47
3.7.2. Produção de biofilme	47
3.7.3. Caracterização das cepas de <i>E. coli</i> produtoras de toxina Shiga (STEC)	48
3.8. Perfil clonal das cepas.....	52
3.8.1. <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE).....	52
3.8.2. Sequenciamento de genoma completo (WGS).....	52
3.9. Análises estatísticas	53
IV - RESULTADOS.....	54
4.1. Resistência antimicrobiana em <i>E. coli</i> isoladas da microbiota intestinal de bovinos, caninos, equinos, ovinos e de amostras de água	55
4.2. Resistência à polimixina em <i>E. coli</i> isoladas da superfície externa de dípteros muscoides e da microbiota intestinal de animais coabitantes em propriedades leiteiras.....	67
4.3. Detecção e caracterização das cepas de <i>E. coli</i> produtoras de toxina Shiga (STEC) isoladas da superfície externa de dípteros muscoides e da microbiota intestinal de animais coabitantes em propriedades leiteiras	72
4.4. Perfil de <i>E. coli</i> isoladas de dípteros muscoides e animais coabitantes em propriedades leiteiras e a permanência da resistência a antimicrobianos no ambiente	84
V - DISCUSSÃO.....	107
VI – CONCLUSÕES.....	124
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
IX - ANEXOS	149
ANEXO A - Informação CEUA	150
ANEXO B – Declaração referente à bioética e biossegurança.....	151
ANEXO C – Declaração sobre direitos autorais.....	152

I - Introdução

1.1. *Escherichia coli*

O primeiro registro de *Escherichia coli* foi realizado em 1885 por Theodor Escherich ao examinar microrganismos presentes em mecônio, as primeiras fezes dos recém-nascidos, coletados em hospitais de Munique e Viena (Escherich 1988). Na ocasião denominada *Bacterium coli commune* e posteriormente renomeada em sua homenagem, *E. coli* se tornou protagonista em pesquisas moleculares, farmacêuticas, biotecnológicas e evolutivas, há mais de um século, ao ser utilizada como organismo modelo (Escherich 1988; Blount 2015; Foster-Nyarko e Pallen 2022). O sucesso da utilização de *E. coli* como organismo modelo em diversas pesquisas deve-se à facilidade de isolamento e cultivo garantida pela sua flexibilidade metabólica e amplitude de substrato (Blount 2015).

Escherichia coli é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae da classe Gama-Proteobacteria, com células em formato de bacilo medindo de 1,1 a 1,5 µm de diâmetro e 2 a 6 µm de comprimento, Gram-negativas, peritríquias ou imóveis e de metabolismo anaeróbico facultativo. Apresentam temperatura ótima de crescimento de 37 °C e como características bioquímicas gerais, fermentam lactose, metabolizam lisina, produzem indol, não crescem em citrato, apresentam teste de Voges-Proskauer negativo e não produzem H₂S (sulfeto de hidrogênio) e oxidase (Schaechter 2009; Croxen et al. 2013; Scheutz e Strockbine 2015).

É geralmente descrita como bactéria comensal residente no intestino de animais endotérmicos e répteis, e por vezes como patógenos oportunistas de humanos, outros mamíferos e aves (Croxen et al. 2013; Leimbach et al. 2013; Denamur et al. 2021). A concentração de células por grama de fezes varia entre os animais, e em humanos pode chegar a 10⁹ UFC (unidades formadoras de colônias) (Tenaillon et al. 2010). No intestino grosso, *E. coli* permanece na camada de muco que cobre o tecido epitelial, consumindo seus componentes e sendo liberada parcialmente nas fezes (Tenaillon et al. 2010).

Remanescentes fósseis de *E. coli* já foram encontrados em rochas datadas de bilhões de anos (Berg 2004), demonstrando a ubiquidade da espécie e a resistência em ambientes inanimados (Blount 2015). De fato, *E. coli* pode ser encontrada em amostras de água, solo, plantas e alimentos, além do material fecal (Leimbach et al. 2013; Blount 2015).

1.1.1. Comensais versus patógenos

O comensalismo é uma relação ecológica derivada da simbiose em que um organismo da associação é beneficiado e o outro não é beneficiado nem prejudicado (Haque e Haque 2017). Na Bacteriologia, o termo comensal é tradicionalmente atribuído às bactérias

constituintes da microbiota intestinal, no entanto, nos últimos anos vários estudos têm esclarecido que a relação entre essas bactérias e o hospedeiro é na realidade mutualística, uma forma de simbiose em que ambas as partes envolvidas na associação se beneficiam (Bäckhed et al. 2005; Kamada et al. 2013b; Blount 2015; Haque e Haque 2017; Foster-Nyarko e Pallen 2022).

A microbiota intestinal é resultado de milhões de anos de coevolução entre o hospedeiro e os microrganismos constituintes, cuja relação vai além da disponibilização de nichos e nutrientes pelo hospedeiro – a microbiota contribui para a digestão de nutrientes no hospedeiro, produção de vitaminas K e B12, desenvolvimento do sistema imune associado ao intestino e na prevenção da colonização por patógenos (Kamada et al. 2013b; Blount 2015).

As relações mutualísticas também se aplicam entre microrganismos (Tenaillon et al. 2010). *E. coli*, por exemplo, assim como outros membros do grupo Proteobacteria, não é predominante na microbiota intestinal (Bäckhed et al. 2005), mas como anaeróbico facultativo contribui para a manutenção do ambiente anaeróbico na luz do intestino grosso ao consumir o oxigênio disponível, enquanto se beneficia da disponibilização de nutrientes resultantes do metabolismo de microrganismos anaeróbicos restritos (Tenaillon et al. 2010).

No presente estudo, apesar da não correspondência ecológica do termo, optou-se pela referência tradicional de comensais para as *E. coli* constituintes da microbiota.

Escherichia coli apresenta cepas comensais e patogênicas, particularidade que aliada a facilidade de isolamento e cultivo, permite a condução de pesquisas em temas como a evolução da patogenicidade e da seleção e disseminação da resistência a antimicrobianos (Tenaillon et al. 2010).

Segundo Denamur et al. (2021), a presença de cepas comensais e patogênicas em uma mesma espécie ainda é um tema em discussão, mas nesse contexto a hipótese da evolução coincidente tem sido aceita. Essa hipótese considera que a virulência teria evoluído em cepas comensais para outras funções diferentes da patogenicidade, como para aumentar a capacidade de colonização e persistência no intestino. Isso explicaria a existência de cepas comensais portadoras de genes de virulência.

A partir daí, a diversidade de tipos patogênicos dentro da mesma espécie teria sido estabelecida pela transferência horizontal de genes de virulência (Lu et al. 2016). Tal que, *E. coli* extraintestinais, por exemplo, seriam produto da seleção de cepas comensais dotadas de genes inicialmente adaptativos, garantindo a aptidão e sobrevivência dessas cepas em nichos fora do intestino do hospedeiro (Yu et al. 2021).

Nesse contexto, a pressão seletiva no ambiente intestinal promoveria a seleção de fatores de virulência e determinantes de resistência em cepas comensais, de modo que essas cepas podem ser consideradas reservatórios de virulência e de resistência a antimicrobianos (Tenaillon et al. 2010).

Desde a década de 1980, a aplicação de métodos moleculares utilizando a coleção de *E. coli* de referência (ECOR), tem demonstrado o agrupamento filogenético de cepas, então denominados filogrupos (Clermont et al. 2013; Leimbach et al. 2013; Denamur et al. 2021). Atualmente são admitidos nove grupos filogenéticos para *E. coli* clássica ou *sensu stricto* (A, B1, B2, C, D, E, F, G e H) e um pertencente à *Escherichia* clado I, também conhecida como *E. coli sensu lato*¹ (Denamur et al. 2021).

Com a popularização da abordagem de Sequenciamento de Genoma Completo – WGS, do inglês *Whole Genome Sequencing* – a caracterização e as relações entre os grupos filogenéticos têm sido esclarecidas. O cladograma de *E. coli* apresenta topografia com divisão em dois clados principais, um composto pelos grupos A, B1, C e E, e o segundo pelos grupos B2, G, F, D e H (Denamur et al. 2021).

Linhagens do filogrupo A, muitas vezes são associadas às cepas comensais presentes em humanos; o filogrupo B2 apresenta várias cepas de *E. coli* patogênicas extraintestinais; B1 inclui diferentes grupos patogênicos e comensais e é predominante em animais (Tenaillon et al. 2010; Leimbach et al. 2013).

A diversidade encontrada em *E. coli* demonstra que pode haver uma linha tênue entre cepas comensais e patogênicas, de modo que a patogenicidade também parece depender do nicho e do sítio de infecção, portanto bactérias comensais, constituintes da microbiota intestinal podem ser inofensivas no intestino, mas patogênicas quando presentes em outros órgãos ou tecidos (Kaper et al. 2004; Tenaillon et al. 2010; Leimbach et al. 2013; Blount 2015; Denamur et al. 2021; Yu et al. 2021).

1.1.2. *Escherichia coli* patogênicas

Várias classificações e subclassificações têm sido adotadas para *E. coli* patogênicas sendo comum a utilização de acrônimos (Denamur et al. 2021). Podem ser divididas em dois grandes grupos conforme o sítio de infecção – aquelas relacionadas à patogenicidade intestinal ou diarreicogênicas são denominadas *E. coli* patogênica intestinal (IPEC ou InPEC) (Figura 1) e apresentam via de transmissão fecal-oral (Croxen et al. 2013).

¹ Há indícios que *Escherichia* clado I e *E. coli* são subespécies da mesma espécie, por esse motivo as denominações *E. coli sensu lato* e *sensu stricto* têm sido sugeridas (Denamur et al. 2021).

As que produzem infecção fora do intestino são denominadas *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) (Leimbach et al. 2013).

Uma subdivisão bastante conhecida considera a classificação em patotipos, que correspondem ao agrupamento de cepas de uma espécie que causam doença em um hospedeiro específico por meio de um mesmo conjunto de fatores de virulência (Kaper et al. 2004; Denamur et al. 2021). As denominações são atribuídas considerando os órgãos-alvo, hospedeiro infectado, associação entre o órgão e o hospedeiro, patologia envolvida, presença de gene(s) específico(s) e um fenótipo específico *ex vivo* (Denamur et al. 2021).

Atualmente os patotipos mais usuais são (Shpigel et al. 2008; Croxen et al. 2013; Denamur et al. 2021):

- InPEC: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC ou EAggEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC/*Shigella*), *E. coli* que adere difusamente (DAEC), *E. coli* aderente-invasiva (AIEC);
- ExPEC: *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC), *E. coli* patogênica para aves (APEC), *E. coli* associada à pneumonia, *E. coli* patogênica mamária (MPEC).

Além desses, dois patotipos híbridos têm sido descritos. Um com características de EHEC e EAEC, e outro com características de EHEC e ExPEC, o que tem sugerido que o agrupamento e a classificação em patotipos podem ser complexos e difíceis de seguir (Denamur et al. 2021).

Apesar de não haver uma relação direta entre as linhagens filogenéticas e os patotipos (Leimbach et al. 2013), EHEC, ETEC e EIEC são frequentemente encontrados em cepas do filogrupos A, B1 e E, além de cepas ExPEC geralmente serem atribuídas aos filogrupos B2 e D (Yu et al. 2021). Isso sugere a evolução convergente dos patotipos de *E. coli* com participação de elementos móveis como plasmídeos, bacteriófagos e ilhas de patogenicidade na transferência horizontal de genes (Kaper et al. 2004; Leimbach et al. 2013).

Frequentemente cepas patogênicas são classificadas conforme a composição antigênica, uma vez que os patotipos tendem a compartilhar os mesmos antígenos (Kaper et al. 2004). A metodologia clássica padrão utiliza a sorologia para a determinação dos sorogrupos (tipagem do antígeno O) ou sorotipos (tipagem dos antígenos O, H e as vezes K), mas atualmente outros métodos como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR),

sequenciamento Sanger e WGS também são empregados (Kaper et al. 2004; Denamur et al. 2021).

O antígeno O, somático, é constituinte do lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas e são reconhecidos 186 tipos, H é um antígeno flagelar com 53 tipos e K, capsular, e apresenta 67 tipos reconhecidos (Kaper et al. 2004; Denamur et al. 2021).

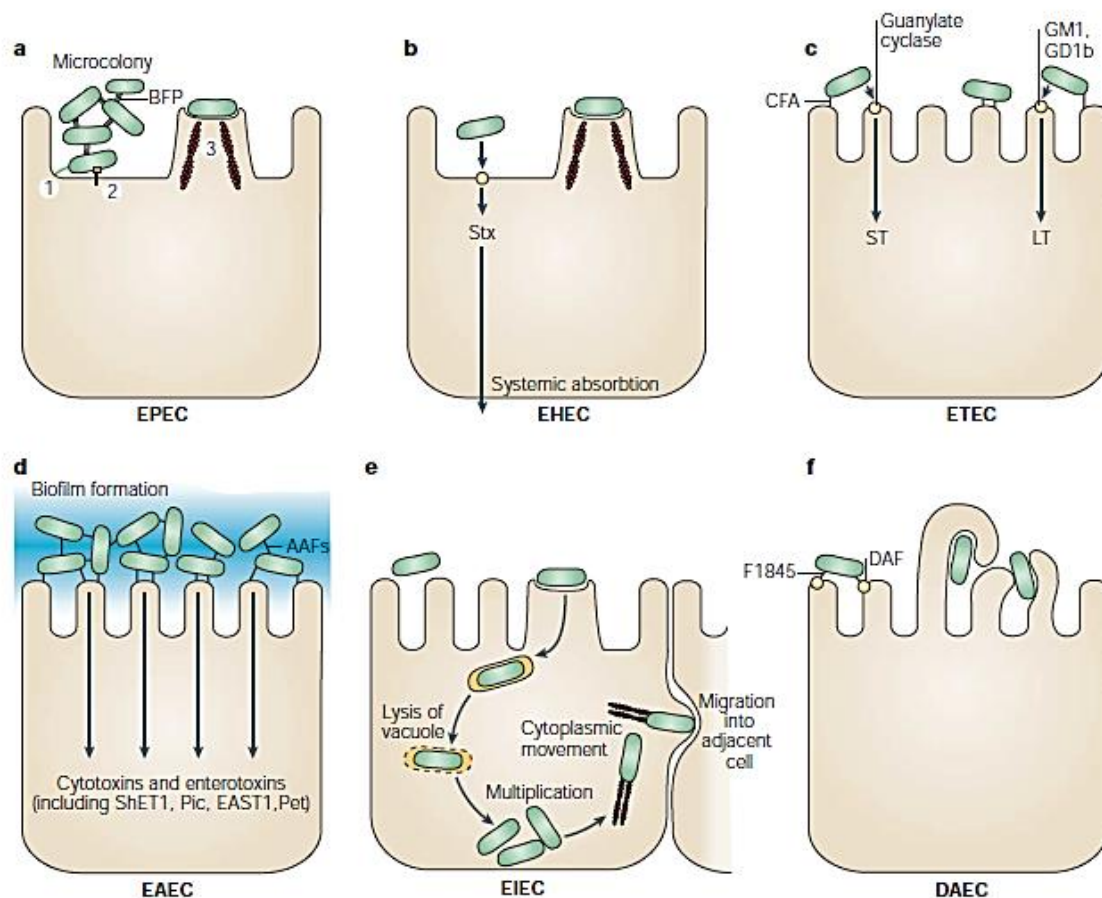


Figura 1. Esquema dos principais patótipos de *Escherichia coli* patogênica intestinal ou diarreicogênica. Fonte: Kaper et al. (2004).

E. coli enteropatogênica (EPEC), foi o primeiro patótipo descrito, relacionado a surtos de diarreia em crianças na década de 1940. A principal característica do grupo é a produção de uma lesão na superfície do epitélio intestinal semelhante a um pedestal devido às mudanças no citoesqueleto provocadas pela bactéria, conhecida como *attaching and effacing* (A/E). Essa lesão é expressa pelos genes da ilha de patogenicidade *locus of enterocyte effacement* (LEE) localizada no cromossomo dessas bactérias. Cepas de EPEC são subdivididas em típicas ou atípicas, respectivamente, de acordo com a presença ou ausência

do plasmídeo EAF, portador do gene para o fator de aderência *bfp* (Kaper et al. 2004; Croxen et al. 2013; Denamur et al. 2021).

A detecção do gene *eae* que decodifica uma intimina (proteína de adesão) é considerada um marcador para a presença da ilha de patogenicidade LEE (Paton e Paton 2002a). Igualmente as EPECs, as *E. coli* entero-hemorrágicas (EHEC) também apresentam ilha de patogenicidade LEE, e adicionalmente o(s) gene(s) para a produção de toxina Shiga como as STECs (Kaper et al. 2004). As *E. coli* produtoras de toxina Shiga estão discutidas a seguir no item 1.1.3.

O patotipo de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), configura uma das principais causas de diarreia em países em desenvolvimento, sendo considerada endêmica em vários deles e responsável por uma taxa de mortalidade significativa em crianças (Croxen et al. 2013).

Tais cepas são caracterizadas pela produção de uma ou ambas as toxinas – toxina termolábil (LT) e/ou toxina termoestável (ST) –, colonizando o epitélio do intestino delgado com a participação de diversos fatores de colonização, agrupados em fatores de colonização antigênicos (CFAs), antígenos de superfície coli (CS) e fatores de colonização possíveis (PCF) (Kaper et al. 2004; Croxen et al. 2013). ETEC é patogênica para humanos e outros animais, mas os fatores de colonização apresentam especificidade com o hospedeiro (Alterthum 2015).

Cepas de *E. coli* enteroagregativas (EAEC) têm sido associadas a quadros de diarreia persistente em crianças e adultos no mundo todo, sendo considerada endêmica em algumas regiões (Croxen et al. 2013). Apresentam adesão agregativa em células HEp-2 (carcinoma de laringe) ou HeLa (carcinoma de colo uterino) *in vitro*, em que as células bacterianas exibem um padrão de adesão ordenado semelhante a tijolos empilhados, devido a presença de fímbrias de aderência agregativa (AAFs) (Kaper et al. 2004; Alterthum 2015). Não apresentam as toxinas LT ou ST, mas toxinas como a termoestável de *E. coli* enteroagregativa (EAST), cujo gene *astA* também pode ser encontrado em cepas comensais, *Shigella enterotoxin 1* (ShET1), *protein involved in intestinal colonization* (Pic) e *plasmid-encoded toxin* (Pet) (Kaper et al. 2004). Além disso, EAEC podem albergar fatores de virulência diversos regulados pelo ativador de transcrição AggR (Kaper et al. 2004).

E. coli enteroinvasiva (EIEC) e *Shigella* spp. são indistinguíveis a nível de espécies, porém, as nomenclaturas distintas têm se mantido devido ao histórico e a importância clínica de *Shigella*. A infecção por EIEC/*Shigella* pode ocasionar colite, disenteria e, na maioria dos casos, diarreia aquosa (Kaper et al. 2004).

Cepas de EIEC/*Shigella* são denominadas invasivas devido à capacidade de penetração no epitélio intestinal proporcionada pela presença do plasmídeo pINV, sendo assim classificadas como patógenos intracelulares. A bactéria penetra na barreira epitelial do intestino através das células M, posteriormente lisa o fagossomo e migra para células epiteliais adjacentes. Além dos fatores de virulência localizados no plasmídeo pINV, apresentam gene para enterotoxina *Shigella enterotoxin 2* (ShET2) localizado no cromossomo (Croxen et al. 2013).

Diferente das EAECs, cepas de *E. coli* que adere difusamente (DAEC) apresentam um padrão de adesão difuso em células HEp-2 e produzem efeito citopático ao provocar o desenvolvimento de extensões que envolvem a bactéria aderida ao epitélio intestinal com a participação de adesinas da família AFA/Dr. Os quadros de diarreia ocasionados por DAEC geralmente acometem crianças de até um ano de idade (Kaper et al. 2004).

E. coli aderente-invasiva (AIEC) tem sido associada à doença de Crohn, uma doença inflamatória crônica do intestino resultante da interação de vários fatores. Pode afetar crianças e adultos e acomete principalmente o intestino delgado (Palmela et al. 2018).

Como a denominação do patotipo sugere, AIEC adere e invade o epitélio intestinal e se multiplica dentro dos macrófagos sem induzi-los a morte (Palmela et al. 2018). Vários fatores de virulência têm sido identificados, mas a participação deles na patogênese ainda não é compreendida (Croxen et al. 2013; Palmela et al. 2018).

Apesar das descrições dos patotipos e a patogênese ser direcionada para humanos, STEC, EHEC, ETEC são encontrados em fezes de gado e animais silvestres, enquanto ExPEC tem sido descrito em humanos, aves, gado, animais de companhia e raramente em animais selvagens, o que sugere potencial zoonótico (Denamur et al. 2021; Foster-Nyarko e Pallen 2022).

Cepas de ExPEC não apresentam um conjunto de fatores de virulência característico e diretamente relacionado à patogênese, uma vez que várias combinações podem levar ao desenvolvimento da mesma doença (Leimbach et al. 2013). Essa ampla gama de fatores de virulência demonstra a plasticidade genômica de ExPEC (Sarowska et al. 2019). No entanto, genes que codificam para toxinas, sistema de aquisição de ferro, adesinas, LPS, cápsula, protease e invasinas, são frequentemente identificados em cepas de ExPEC (Leimbach et al. 2013; Sarowska et al. 2019).

Como discutido anteriormente, cepas ExPEC e comensais compartilham vários genes e a distinção entre elas pode ser complexa. Nesse sentido tem-se empregado a classificação de plasmídeos, pois alguns tipos parecem estar mais relacionados às cepas

comensais, e à existência de genes preditores de patogenicidade como *hlyA* (alfa-hemolisina), *fyuA* (receptor de yersiniabactina), *traT* (proteína de membrana externa associada à resistência sérica), *iutA* (receptor de aerobactina) (Leimbach et al. 2013; Sarowska et al. 2019).

Entre os patótipos de ExPEC, *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* patogênica para aves (APEC) são as mais conhecidas e estudadas (Alterthum 2015). Cepas UPEC causam infecção do trato urinário em humanos e animais, geralmente a contaminação ocorre por meio de UPEC que colonizam o intestino do hospedeiro inocuamente. Cepas APEC causam colibacilose em aves podendo acometer diversos órgãos e gerando patologias como celulite aviária e síndrome da cabeça inchada (Kaper et al. 2004; Sarowska et al. 2019).

Um novo patótipo de ExPEC, *E. coli* patogênica mamária (MPEC), tem sido proposto e associado à mastite bovina (Shpiguel et al. 2008), porém ainda não há um consenso sobre os fatores de virulência associados à infecção e à completa aceitação do patótipo pela comunidade científica, uma vez que estudos sugerem que as *E. coli* associadas à mastite ocorrem naturalmente como comensais no intestino dos bovinos e que o processo de infecção estaria mais relacionado à susceptibilidade imunológica das vacas e não propriamente a uma invasão do tecido, o que sugere que as *E. coli* associadas à mastite sejam tratadas como patógenos oportunistas (Goulart e Mellata 2022).

1.1.3. *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC)

O patótipo STEC refere-se às cepas de *E. coli* que apresentam toxina Shiga (Stx), também conhecida como verotoxina (acrônimo VTEC) devido à citotoxicidade observada *in vitro* em células Vero (Koutsoumanis et al. 2020). EHEC é tradicionalmente considerado subgrupo de STEC devido à presença da ilha de patogenicidade LEE com a lesão A/E, causando colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU) em humanos (Kaper et al. 2004; Croxen et al. 2013; Koutsoumanis et al. 2020). No entanto essa divisão tende a ser descontinuada, uma vez que STEC não portadoras de LEE (LEE-negativas), também podem ocasionar CH e SHU em humanos, de modo que STEC e EHEC têm sido consideradas sinônimos (Kaper et al. 2004; Koutsoumanis et al. 2020; Denamur et al. 2021).

A toxina Shiga é composta por duas subunidades (A, subunidade de clivagem e B, subunidade de ligação) e compreende dois tipos (Stx1 e Stx2) e suas variantes, Stx1 (a, c, d, e) e Stx2 (a ao l), sendo que cepas portadoras de Stx2 são consideradas mais virulentas (Kaper et al. 2004; Koutsoumanis et al. 2020). Quando liberadas no intestino provocam diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, necrose e perfuração intestinal, podendo alcançar os rins pela corrente sanguínea e causar inflamação renal e indução de apoptose das células do

endotélio renal, ação que pode desenvolver síndrome hemolítica urêmica e gerar dano fatal para o paciente (Kaper et al. 2004).

Os genes *stx1* e *stx2* que codificam as toxinas Stx são parte de um bacteriófago *lambda-like* que se encontra integrado ao cromossomo das cepas de STEC na forma de profagos. Acredita-se que a resposta SOS da bactéria, antimicrobianos da classe das quinolonas e outras condições como temperatura e densidade populacional ativem o ciclo lítico desses fagos que passam a expressar as toxinas, de modo que a liberação ocorre com a lise da bactéria (Pacheco e Sperandio 2012; Croxen et al. 2013).

Atualmente há vários métodos disponíveis para a identificação de STEC tais como métodos imunológicos como ELISA e PCR para detecção de *stx1* e *stx2* e outros fatores de virulência (Koutsoumanis et al. 2020), porém o ensaio de citotoxicidade em células Vero é considerado a metodologia “ouro” (Pacheco e Sperandio 2012).

A hipótese aceita para cepas STEC/EHEC, discute que EHEC teria evoluído a partir de EPECs que adquiriram o fago Stx. O sorotipo O157:H7 é o mais importante e foi o primeiro a ser associado aos surtos de EHEC na década de 1980. Além desse, seis outros sorogrupos conhecidos como *big six* são frequentes (O26, O45, O103, O111, O121, O145) (Kaper et al. 2004; Croxen et al. 2013).

STEC pode albergar Stx1, Stx2 ou ambos. Adicionalmente, outros fatores de virulência, advindos de plasmídeos ou ilhas de patogenicidade, podem estar presentes e são necessários para a patogenicidade das cepas. Alguns desses fatores são: *ehxA* (enterohemolisina), *katP* (catase-peroxidase), *toxB* (toxina B) e *espP* (serina protease), além da ilha de patogenicidade LEE (Croxen et al. 2013).

Até o momento foram identificadas três ilhas de patogenicidade em cepas de STEC LEE-negativas envolvidas em colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica – *locus of proteolysis activity* (LPA), *subtilase-encoding pathogenicity island* (SE-PAI) e *locus of adhesion and autoaggregation* (LAA) (Montero et al. 2019).

A ilha de patogenicidade LAA tem emergido em cepas de STEC LEE- negativas e têm sido identificadas em STEC isoladas de diferentes fontes no Paraguai e Chile. Nesse sentido, o gene *hes* (hemaglutinina de *E. coli* produtora de toxina Shiga) tem sido apontado como marcador da ilha LAA. Além do gene *hes*, a adesina autoaglutinante (Saa) também tem sido associada à patogenicidade de STEC LEE-negativa (Vélez et al. 2020).

Os bovinos e outros ruminantes saudáveis constituem os principais reservatórios de STEC, o que implica grande potencial zoonótico, porém alguns sorotipos podem causar diarreia aguda em bezerros recém-nascidos (Shaw et al. 2004; Piérard et al. 2012). Em

humanos, a transmissão ocorre principalmente por meio de água ou alimentos contaminados ou pelo contato entre pessoas e animais (Kaper et al. 2004; Croxen et al. 2013).

As doenças em humanos causadas por STEC são esporádicas em países da América Latina, apesar de ser considerada endêmica na Argentina por apresentar maior incidência. No Brasil, registros de CH e SHU são raras e não há registro de surtos, no entanto altos índices de prevalência de STEC em rebanhos bovinos têm sido reportados – até 48,5% no estado de São Paulo, 68% no Rio Grande do Sul e 78.3% na região centro-oeste (Castro et al. 2019; Gonzalez e Cerqueira 2020).

1.2. RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

A existência de *E. coli* comensal em humanos e animais, além de estudos sobre patogenicidade e virulência, também permite a condução de estudos sobre a emergência de resistência antimicrobiana e propagação dos determinantes gênicos relacionados. A grande densidade de bactérias disponível no ambiente intestinal, aliada à exposição a antimicrobianos, fornece um cenário propício para a seleção de resistência a antimicrobianos na microbiota intestinal (Tenaillon et al. 2010).

Consequentemente, os hospedeiros animais dessas bactérias também poderiam ser denominados reservatórios, uma vez que permitem a manutenção e a transmissão do agente microbiano (Haydon et al. 2002). Além disso, trabalhos desenvolvidos com *E. coli* podem contribuir para o direcionamento de estudos em outras bactérias do mesmo nicho (O'Brien 2002).

A resistência a antimicrobianos em bactérias é um evento natural e é ocasionada por duas situações (Allel et al. 2023; Darby et al. 2023). A primeira, chamada resistência intrínseca, corresponde à resistência proporcionada por genes constitutivos, que são aqueles direcionados à proteção da célula a agentes nocivos do ambiente ou aqueles que codificam outras funções necessárias a bactéria e simultaneamente servem à resistência a antimicrobianos. A segunda, corresponde à resistência adquirida cujos genes não fazem parte do genoma central (*core genome*) e são mobilizados pelos mecanismos de transferência horizontal de genes (HGT, do inglês *horizontal gene transfer*) (van Hoek et al. 2011; Darby et al. 2023).

Os mecanismos de resistência utilizados pelas bactérias podem ser categorizados em: inativação do antimicrobiano, proteção ou modificação do sítio-alvo, bombas de efluxo e desvio do sítio-alvo ou da via metabólica. A inativação do antimicrobiano ocorre com a

degradação ou modificação da molécula, mediada por uma enzima produzida pela bactéria. A proteção do sítio-alvo é realizada pela ligação de uma proteína expressa pela bactéria ao sítio-alvo do antimicrobiano, e a modificação ocorre por mutações no gene que codificam a proteína alvo. As bombas de efluxo, geralmente não são específicas e favorecem a resistência ao facilitar o transporte da molécula antimicrobiana para fora da célula. E os desvios de sítio-alvo ou vias metabólicas é ocasionada pela expressão de uma nova proteína pela bactéria com a mesma função da proteína alvo do antimicrobiano, mas que não apresenta sítio-ativo para o tal (Darby et al. 2023).

Além desses mecanismos, a formação de biofilmes também vem sendo apontada como um mecanismo de resistência ligado à comunidade de células bacterianas, uma vez que o biofilme consiste em um agregado de células mantidos por uma matriz extracelular polissacarídica, responsável pela impermeabilização aos antimicrobianos. Adicionalmente, as células que compõem o biofilme parecem ter certo grau de diferenciação que permite a resistência às adversidades do ambiente e a transferência horizontal de genes elevada (Darby et al. 2023).

Os antimicrobianos beta-lactâmicos são os mais conhecidos e utilizados desde 1940 quando a penicilina começou a ser administrada para o tratamento de infecções humanas, e ainda hoje são os mais utilizados na clínica (Bush e Bradford 2019; Tooke et al. 2019). Compreendem as classes das penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (Tooke et al. 2019) e atuam inibindo as proteínas de ligação a penicilina (PBPs, do inglês *Penicillin-Binding Proteins*), impedindo as ligações transpeptídicas cruzadas do peptideoglicano, levando à lise celular (Darby et al. 2023).

Os mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos compreendem a produção de enzimas beta-lactamases que promovem a hidrólise do anel beta-lactâmico, modificações nas PBPs, diminuição da permeabilidade e aumento do efluxo (Tooke et al. 2019; Darby et al. 2023).

Em Gram-negativos o mecanismo principal deve-se a produção de beta-lactamases expressas por genes localizados no cromossomo em vários gêneros (Bradford 2001; Tooke et al. 2019). O primeiro registro de beta-lactamase mediada por plasmídeo, então denominada TEM-1, foi realizado na década de 1960 em um isolado de *E. coli* obtido da cultura sanguínea de uma paciente da Grécia, e hoje consiste em um dos genes de resistência mais disseminados entre várias espécies bacterianas (Bradford, 2001).

As beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) apresentam a capacidade de hidrolisar os beta-lactâmicos de nova geração, principalmente as oximino-cefalosporinas.

Apresentam importância epidemiológica devido à associação com plasmídeos e transposons. Muitas são derivadas das enzimas de amplo espectro TEM e SHV, sendo que a ESBL SHV-2 foi a primeira descrita. Outras ESBLs difundidas e bastante investigadas pertencem às famílias CTX-M e OXA (Bradford 2001), sendo CTX-M atualmente considerada a ESBL mais comum devido à sua ampla distribuição (Bush e Bradford 2019).

A emergência de cepas multirresistentes tem levado à retomada de antimicrobianos até então em desuso, como as polimixinas, administradas como medicamentos de último recurso em uso clínico hospitalar para tratamentos de infecções por essas cepas (Olaitan et al. 2014; Li et al. 2019; Rhouma et al. 2023).

As polimixinas são antimicrobianos polipeptídeos básicos, inicialmente isoladas do bacilo *Paenibacillus polymyxa* (Sherry e Howden 2018). Atualmente são utilizadas na medicina humana duas moléculas, a polimixina B e a colistina, uma mistura de polimixina E1 e E2 (WHO, 2018).

O mecanismo de ação desses antimicrobianos está relacionado à interação entre as cargas da molécula de polimixina com as cargas negativas do grupo fosfato presente no lipídeo A, constituinte do LPS da parede celular de bactérias Gram-negativas. Isso desestabiliza a membrana externa ao deslocar cátions Mg^{2+} e Ca^{2+} , provocando extravasamento celular e consequentemente a morte da bactéria (Rhouma et al. 2023).

Escherichia coli é naturalmente sensível às polimixinas, no entanto mecanismos de resistência têm sido verificados através de mutações cromossômicas e em genes mobilizados por plasmídeos (*mcr* genes) (Sherry e Howden 2018; Li et al. 2019). Ambos modificam o LPS por meio da enzima P_{ET}N transferase ou pela mutação L-Ara4N (Li et al. 2019). As mutações cromossômicas geram modificações no operon *pmrCAB*, o sistema de dois componentes *phoPQ* e o regulador *mgrB*, operon *pmrHFIJKLM*, gene *pmrE* e o operon *crrAB* (Figura 2). Já os genes *mcr* codificam a enzima P_{ET}N transferase que alteram a carga elétrica do lipídeo A (Li et al. 2019). Além desses, resistências mediadas pela ação de bombas de efluxo e formação de cápsula também têm sido documentadas (Olaitan et al. 2014).

A descoberta da resistência à polimixina mediada por plasmídeo em 2015 (Liu et al. 2016) aliada à retomada da administração sistêmica de polimixina em humanos (Olaitan et al. 2014), têm motivado a pesquisa de genes em isolados humanos, animais e ambientais nos últimos anos (WHO 2018), sendo que até o momento há dez homólogos descritos (*mcr-1* ao *mcr-10*) (Rhouma et al. 2023).

Acredita-se que a disseminação da resistência à polimixina deve-se à utilização indiscriminada na produção animal (WHO 2018) e desde a primeira detecção do gene *mcr-1*,

vários países têm proibido o uso de colistina como promotor de crescimento em animais de produção (Mendes Oliveira et al. 2019). No Brasil, a utilização de sulfato de colistina como promotor de crescimento segue proibida desde 2016 (MAPA 2016).

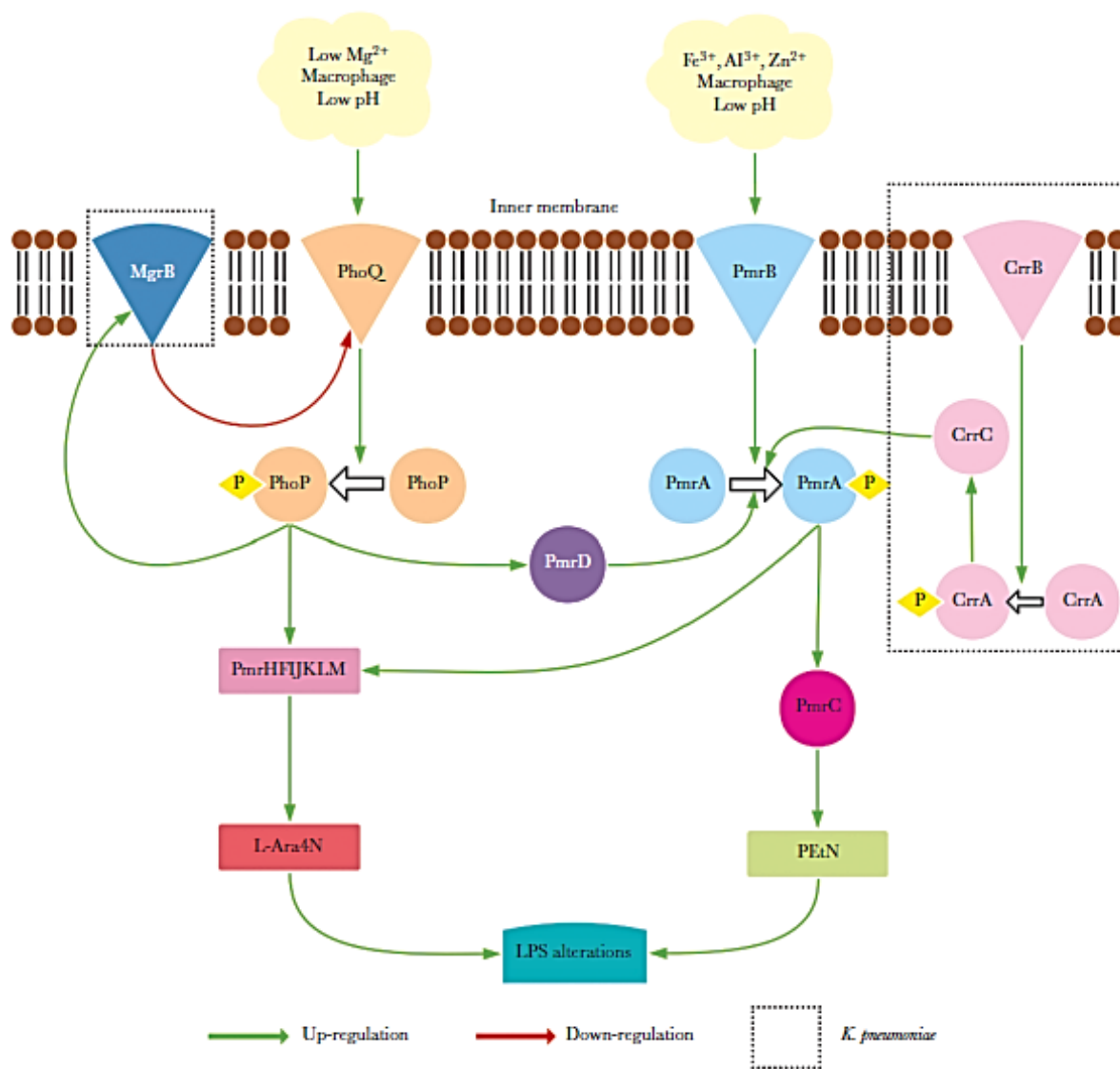


Figura 2. Esquema dos mecanismos de resistência à polimixina mediados por mutações no cromossomo de bactérias Gram-negativas. Fonte: Li et al. 2019.

Na interface humanos, animais e ambiente, as tetraciclinas também se destacam devido ao amplo uso em humanos e animais, e à excreção de metabólitos ativos que não são efetivamente removidos pelos sistemas de tratamento de água (Daghrir e Droguí 2013).

No Brasil, o uso de tetraciclina como promotor de crescimento, aditivo alimentar ou como conservante permanece proibido desde 1998 (MAPA, 2009). Apesar disso, outros países ainda utilizam dessa prática (Daghrir e Drogui 2013).

As tetraciclinas inibem a síntese de proteínas nas bactérias impedindo a ligação do RNA transportador ao ribossomo. A maioria dos determinantes de resistência às tetraciclinas estão relacionados à síntese de bombas de efluxo, seguidos das proteínas que protegem o sítio-alvo da tetraciclina nos ribossomos e inativação enzimática, todos geralmente associados aos plasmídeos conjugativos ou elementos genéticos móveis (Chopra e Roberts 2001).

1.3. DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

As interfaces que permeiam a disseminação de genes de resistência estão estreitamente relacionadas à abordagem da Saúde Única (em inglês, *One Health*) atualmente em pauta, uma vez que a utilização de antimicrobianos e as rotas de disseminação de genes de resistência antimicrobiana envolvem as áreas da medicina humana, veterinária, saneamento e meio ambiente (McEwen e Collignon 2018).

Apesar do uso indiscriminado de antimicrobianos ser considerado o principal responsável pela disseminação mundial de genes de resistência (Allel et al. 2023), resíduos de substâncias antimicrobianas no ambiente podem exercer pressão seletiva necessária à manutenção da resistência antimicrobiana. Gullberg et al. (2014) verificaram que concentrações subletais de antimicrobianos foram suficientes para a transferência de determinantes de resistência por conjugação. No entanto, os resultados obtidos por Lopatkin et al. (2016) sugeriram que outros fatores como a integridade celular e a dinâmica populacional podem atuar na determinação dos eventos de conjugação bacteriana.

No ambiente, a pressão seletiva é mantida pela disponibilização de antimicrobianos por três setores principais que polarizam as várias rotas de disseminação: medicina veterinária, agricultura e medicina humana (Cantas et al. 2013). A disponibilização ocorre por meio das excretas de humanos e animais, descarte inadequado, aplicação direta na atividade de aquicultura, escoamento e percolação no solo e resíduos da indústria farmacêutica (Koutsoumanis et al. 2021; Larsson e Flach 2022).

A partir daí mecanismos evolutivos passam a conduzir a fixação de genes de resistência em populações bacterianas. Tais genes no decorrer do processo de disseminação podem se associar a elementos de inserção, formar cassetes de genes e se incorporar em integrons, que por sua vez podem se integrar a elementos conjugativos, como plasmídeos.

Com a conjugação diferentes cepas, comensais ou patogênicas, podem se tornar resistentes aos antimicrobianos relacionados aos genes adquiridos (Tenaillon et al. 2010; Larsson e Flach 2022).

Adicionalmente às rotas e fontes de disseminação, especula-se que tal fenômeno é multifatorial e interdependente, envolvendo fatores econômicos, climáticos, políticas de saúde pública, infraestrutura e globalização. Seguindo essa linha, a maior demanda por alimentos, decorrente do aumento populacional, por exemplo, pode demandar aumento da produção animal e consequentemente maior utilização de antimicrobianos (Allel et al. 2023).

No âmbito da produção de alimentos de origem animal, a proximidade entre o ambiente animal e humano favorece a disseminação de genes e de cepas portadoras de resistência que ocorre por meio do contato direto com os animais ou por intermédio de rotas ambientais. Essas rotas incluem os animais domésticos, ou domesticados, seus excrementos e cultivo de vegetais, de modo que um fator importante para a disseminação de bactérias resistentes pode ser a aplicação de esterco como fertilizante (Khachatourians 1998; Liebana et al. 2006; Marshall et al. 2009; da Costa et al. 2013).

A atividade de adubar a terra com esterco pode contribuir para a disseminação de bactérias resistentes em mananciais (Baquero et al. 2008; Koutsoumanis et al. 2021), ao alcançar lençóis freáticos devido à percolação no solo, propagando bactérias entéricas de animais para humanos (Novais et al. 2013; Koutsoumanis et al. 2021).

Apesar de vários estudos terem como tema a resistência antimicrobiana no ambiente, uma análise mais abrangente sobre os elementos genéticos e o perfil clonal das cepas presentes na disseminação são secundários (Novais et al. 2013). No entanto, pesquisas direcionadas à investigação de resistência no ambiente têm sido incentivadas com o objetivo de entender a dinâmica de circulação da resistência (Koutsoumanis et al. 2021).

Recentemente, Fuga et al. (2022), investigaram cepas de *E. coli* isoladas de humanos, animais e do ambiente entre os anos 1974 e 2019 no Brasil, a fim de inferir aspectos da disseminação da resistência a antimicrobianos no país e constataram a circulação de clones reconhecidos internacionalmente e apontaram a natureza endêmica de CTX-M e MCR-1.

No Brasil, apesar de vários trabalhos abordarem os aspectos epidemiológicos da resistência em bactérias isoladas em hospitais, pesquisas que relacionam isolados de origem animal e ambiental ainda são escassas (Korb et al. 2011; Silva et al. 2013).

1.3.1. Mecanismos moleculares da disseminação

A disseminação dos genes de resistência a antimicrobianos entre cepas bacterianas deve-se ao mecanismo de transferência horizontal – transformação com a interiorização de DNA livre, conjugação com a participação de elementos genéticos móveis e transdução com a participação de bacteriófagos. No entanto, é conhecido que grande parte, ocorre por meio da mobilização de plasmídeos por conjugação (Frost et al. 2005; Larsson e Flach 2022).

Os elementos genéticos móveis (MGE, do inglês *mobile genetic elements*) são elementos que facilitam a mobilização de genes dentro da célula, entre cromossomo e plasmídeos e/ou entre células. São incluídos na categoria, as sequências de inserção (IS, *insertion sequences*), transposons (Tn), integrons (In), plasmídeos e elementos conjugativos integrativos (ICE, *integrative conjugative elements*) (Partridge et al. 2018).

As IS são elementos pequenos que albergam um a dois genes de transposases (*tnp*) e podem ser definidas por sequências repetidas invertidas localizadas nas extremidades do gene *tnp*. São classificados em grupos conforme a transposase e/ou a natureza da transposição – conservativa, quando há a excisão e a inserção sem modificações das sequências e, replicativa, quando ocorre a replicação da IS. Participam da mobilização de genes de resistência aos antimicrobianos quando constituintes de transposons compostos (Partridge et al. 2018).

Os transposons em bactérias estão intimamente relacionados à mobilização de genes de resistência e são definidos pela presença de sequências de inserção, do gene *tnp* e um gene transitório geralmente de resistência (Babakhani e Oloomi 2018; Partridge et al. 2018). Quando a transposase e o gene de resistência são flanqueados por ISs, são denominados transposons compostos (Babakhani e Oloomi 2018). As famílias Tn3 e Tn7-like são bastante conhecidas pela mobilização de diversos genes de resistência a antimicrobianos (Partridge et al. 2018).

Os integrons são descritos como elementos genéticos capazes de incorporar quadros de leitura aberta (ORFs, *open Reading frames*), por meio de recombinação sítio específica. Apresentam gene para integrase (*intI*), sítio de recombinação primária (*attI*) e um promotor (Pc). Incorporam no sítio de recombinação, cassetes de genes, constituídos geralmente por um único gene e uma sequência repetida invertida incompleta denominada *attC* (ou elemento de 59-base) (Figura 3). Na porção 3' após a região variável de recombinação e inserção dos cassetes, há uma região conservada composta por um gene de resistência a quaternário de amônio (*qac*) e um gene de resistência à sulfonamida (*sul*) (Mazel 2006).

São categorizados em classes conforme a sequência da integrase, sendo os integrons de classe 1, portadores do gene *intI1*, os mais comuns. Nesses integrons, a expressão da integrase é regulada pela resposta SOS da célula bacteriana. Apresentam na direção 5' a 3', *intI1*, sítio de recombinação 5'-CS, região variável de inserção de cassetes gênicos, sítio de recombinação 3'-CS, genes *qacEΔ1* e *sul1*. Os sítios de recombinação 5'-CS e 3'-CS possuem sequências conservadas (Partridge et al. 2018).

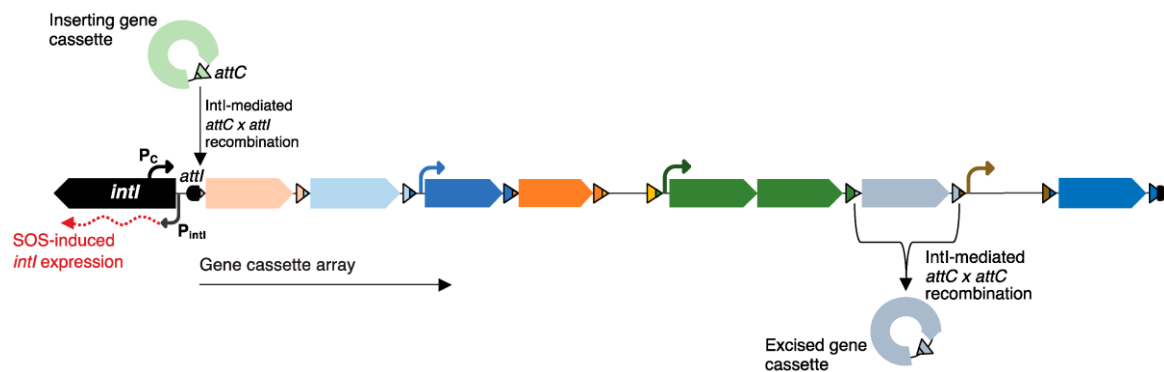


Figura 3. Estrutura típica do integron. Em integrons de classe 1, a expressão da integrase é induzida pela resposta SOS da bactéria. Fonte: Ghaly et al. (2021).

Os plasmídeos são definidos como DNA extracromossomal, circular, capaz de autorreplicação e que albergam genes não essenciais ao metabolismo bacteriano como os de resistência a antimicrobianos (genes acessórios) (Carattoli 2009). Apresentam origem de replicação *ori*, geralmente transcrita pela proteína Rep, cuja sequência é utilizada para a tipagem dos grupos de plasmídeos em grupos de incompatibilidade (Inc/Replicon) (Carattoli 2009; Partridge et al. 2018).

Os plasmídeos conjugativos albergam conjuntos de genes relacionados a mobilidade do DNA (MOB) e ao acoplamento com a célula receptora, denominado complexo de formação do par de acoplamento (MPF, do inglês *mating pair formation*) (Smillie et al. 2010), codificados pelos genes *tra* que conferem a expressão do sistema de secreção do tipo IV (T4SS) que medeia a interação com a célula receptora, e proteínas de transferência e replicação de DNA como a relaxase (Partridge et al. 2018).

Os elementos conjugativos integrativos (ICE), são regiões integradas ao cromossomo bacteriano que apresentam capacidade de autorreplicação e assim como os plasmídeos são transferidos por conjugação. Geralmente apresentam regiões de

integração/excisão semelhante a fagos (*phage-like*), de conjugação semelhante a plasmídeos, um módulo de regulação e a integração de genes acessórios (Partridge et al. 2018).

1.3.2. Propriedades leiteiras no contexto da resistência a antimicrobianos

Diversos autores têm discutido o uso de antimicrobianos na pecuária e a contribuição para a seleção de genes de resistência em bactérias comensais e/ou patogênicas (Marshall et al. 2009; Berglund 2015; Brown-Jaque et al. 2015; Argudín et al. 2017; Xu et al. 2022). Várias fontes sugerem que o uso de antimicrobianos em fazendas é o maior gerador de bactérias multirresistentes (Koutsoumanis et al. 2021) e que a resistência em cepas patogênicas para humanos é decorrente da utilização não terapêutica de antimicrobianos em animais (Xu et al. 2022).

Nesse contexto, a alta demanda de antimicrobianos para a manutenção da produção animal aliada a outras práticas como a reutilização de esterco como adubo, mencionado anteriormente, coloca as fazendas como fontes de genes e de bactérias resistente a antimicrobianos (Wichmann et al. 2014; Xu et al. 2022).

Desse modo, compreender a contribuição da prática agropecuária para a epidemiologia da resistência é essencial (Wichmann et al. 2014). No entanto, é verificado uma menor proporção de pesquisas voltadas à abordagem da disseminação de resistência a antimicrobianos no ambiente agropecuário propriamente dito do que às direcionadas às dinâmicas de transmissão entre humanos e animais (Koutsoumanis et al. 2021).

De fato, é conhecido que cepas isoladas de animais de produção frequentemente apresentam resistência que pode ser disseminada para a comunidade (Vieira et al. 2011), destacando mais uma vez que a importância dos animais e suas cepas comensais como reservatório de genes (Verdier et al. 2012).

Marshall et al. (2009) discutiram que o uso de antimicrobianos na pecuária tem contribuído para a seleção de genes de resistência em bactérias comensais, localizados em elementos móveis como transposons e plasmídeos, o que merece atenção especial, pois indica a possibilidade de transferência gênica entre bactérias comensais e patogênicas, uma vez que ocupam os mesmos nichos intestinais (Kamada et al. 2013a).

Considerando o contexto das fazendas como mantenedor da pressão seletiva a antimicrobianos, o papel dos animais e a importância das cepas comensais para o entendimento do processo de seleção e disseminação da resistência, cepas provenientes de animais saudáveis poderiam constituir em ferramenta de monitoramento (Verdier et al. 2012).

A bovinocultura destinada à produção leiteira é uma das atividades mais expressivas do cenário rural brasileiro, apresentando importância para a economia nacional ao movimentar o mercado interno e externo, chegando a produção de 30,11 bilhões de litros registrado pelo último Censo Agropecuário de 2017 e a representatividade de 7% da produção mundial (Zoccal 2018; Rabello et al. 2020; FAO 2023).

Dada a importância econômica, práticas que visam o monitoramento da sanidade animal são fundamentais para a manutenção da produtividade dos rebanhos leiteiros (Florião 2013). O uso terapêutico e profilático de antimicrobianos faz parte dessas práticas (van den Bogaard e Stobberingh 2000; Florião 2013), uma vez que trazem benefícios como o aumento da produtividade, redução de patógenos, menor ocorrência de doenças, de morbidade e mortalidade (Oliver e Murinda 2012). Em contrapartida, o uso de antimicrobianos na agropecuária pode contribuir para a seleção de resistência, tanto em microrganismos patogênicos, quanto em comensais constituintes da microbiota intestinal dos animais (van den Bogaard e Stobberingh 2000).

No âmbito da produção leiteira bovina a principal aplicação de antimicrobianos consiste na administração para tratamento e prevenção de mastite (Casseri et al. 2022). O tratamento profilático conhecido como “terapia da vaca seca” consiste na administração de antimicrobianos no período não lactante, geralmente por via intramamária, sendo adotado em 80% do rebanho de vacas nos Estados Unidos e no Brasil (Oliver e Murinda 2012; Royster e Wagner 2015; Casseri et al. 2022; Dias et al. 2022). Em bezerras a administração de antimicrobianos ocorre para tratamento de quadros de diarreia com sinais sistêmicos (Constable 2009).

Adicionalmente, o ambiente rural, devido às fezes dos animais e às atividades humanas, é propício ao desenvolvimento de moscas sinantrópicas e/ou simbovinas, como *Musca domestica* (Linnaeus, 1758), *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) e *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758), de modo que dípteros muscoides constituem potenciais vetores de bactérias presentes no ambiente de criação animal (Povolný 1971; Cadavid-Sanchez et al. 2015).

No Brasil alguns estudos buscaram o isolamento de bactérias em *S. calcitrans* (Castro et al. 2007, 2008b, 2008a) e a relação com a ocorrência de enfermidades como a mastite, sugerindo a atuação das moscas como vetores (Moraes et al., 2004), e outros tem investigado a prevalência de moscas no ambiente de ordenha (Bertolini et al. 2022) e a participação de moscas na veiculação e disseminação da resistência a antimicrobianos (Alves et al. 2018). Assim, considerando o comportamento sinantrópico e a história natural de

moscas (Diptera: Muscomorpha), pesquisas sobre as bactérias veiculadas por esses dípteros podem contribuir para o entendimento da disseminação da resistência no ambiente das fazendas.

É importante ressaltar que a disseminação da resistência a antimicrobianos abrange não só a mobilização de elementos genéticos, mas também a propagação de cepas multirresistentes, clones ou não, contexto que muitas vezes é abordado implicitamente nas pesquisas. Porém, no presente estudo indaga-se que a disseminação dos genes de resistência pode ser independente da circulação de cepas clones. Para essa investigação foi escolhido o ambiente de ordenha, isolados de *E. coli* da microbiota intestinal e ambientais e os integrons como marcadores moleculares.

Nesse sentido, este estudo propõe: **i-** demonstrar a disseminação da resistência em *E. coli* isoladas de animais domésticos (vacas, bezerros, cães, entre outros) e dípteros muscoides conviventes em propriedades leiteiras e fontes de água, por meio da caracterização dos determinantes de resistência genéticos; **ii-** caracterizar os fatores de virulência associados à patogenicidade em cepas de *E. coli* produtoras de toxina Shiga; **iii-** caracterizar plasmídeos e integrons e realizar ensaios de conjugação a fim de avaliar a capacidade de disseminação ambiental dos genes de resistência entre as bactérias isoladas de animais e as isoladas das fontes de água das propriedades, e, **iv-** avaliar o perfil clonal das cepas.

II - Objetivos

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a resistência fenotípica e genotípica a antimicrobianos e a disseminação dos genes de resistência em *E. coli* comensais e produtoras de toxina Shiga, isoladas de fezes de bovinos, animais domésticos e da superfície de dípteros muscoides conviventes em propriedades leiteiras e em suas fontes de água.

2.1.1. Objetivos específicos

- Determinar o perfil de sensibilidade fenotípica dos isolados dos animais e das amostras de água frente aos principais antimicrobianos administrados em terapia veterinária e humana;
- Identificar os determinantes genéticos de resistência mais frequentes, associados à produção de beta-lactamases;
- Investigar a resistência à polimixina nos isolados;
- Caracterizar as cepas de *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC);
- Caracterizar as cepas positivas para integron;
- Verificar a capacidade de transferência dos integrons;
- Determinar e avaliar o perfil clonal das cepas positivas para integron e/ou STECs;
- Comparar os perfis de resistência a antimicrobianos entre os isolados de bovinos leiteiros, animais domésticos, dípteros muscoides e de água.

III - Material e Métodos

3.1. AMOSTRAS

As amostras de fezes foram liberadas de aprovação segundo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (CEUA/UNICAMP), protocolo 2066/2017. Todas as amostras foram colhidas de animais saudáveis.

3.1.1. Amostragem inicial

A coleta inicial das fezes dos animais e dos dípteros muscoides foi realizada em junho de 2015 em duas propriedades leiteiras (denominadas A e B) da região de Botucatu, SP (FAPESP Nº 2015/15425-2). Parte da pesquisa utilizando isolados de moscas estão descritos em Alves (2017) e Alves et al. (2018). A metodologia de coleta de fezes e moscas e o isolamento de *E. coli* podem ser verificados no item 3.1.3.

O cultivo foi realizado em ágar MacConkey com adição de ampicilina (50 µg/mL), visando oferecer uma pressão seletiva branda. De cada animal/captura moscas foram inicialmente estocadas cinco colônias sugestivas de *E. coli*. Na Tabela 1 estão apresentados os detalhes sobre os 877 isolados.

Tabela 1. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas no estudo. Animais amostrados em duas propriedades leiteiras de Botucatu, SP (2015).

Propriedade A			Propriedade B		
	Indivíduos	Cepas de <i>E. coli</i>		Indivíduos	Cepas de <i>E. coli</i>
Vacas	48	240	Vacas	8	40
Bezerros	58	284	Bezerros	10	50
Cães	6	25	Carneiro	1	5
Mulas	3	15	Cordeiros	2	10
Éguas	2	10	Moscas*	37	63
Moscas	57	135			
Total		709	Total		168

* Foram coletados 39 insetos, sendo que dois indivíduos não foram contabilizados por não pertencerem ao grupo dos dípteros muscoides (Cicadellidae e Formicidae).

3.1.2. Amostragens posteriores

Visando amplificar os dados para o estudo da disseminação da resistência antimicrobiana e com base em resultados anteriores (Alves 2017), novas coletas foram realizadas em agosto de 2019 e dezembro de 2019 na propriedade A, correspondendo as estações de inverno e verão, respectivamente. O cultivo foi realizado em ágar MacConkey sem e com adição de tetraciclina (50µg/mL), uma vez que os resultados anteriores (Alves 2017) mostraram a transferência do integron por conjugação na presença de tetraciclina.

As coletas das amostras foram realizadas com a colaboração do Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro - Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) - UNESP, Botucatu, SP.

As amostras de água foram coletadas na propriedade A estudada no projeto anterior (FAPESP Nº 2015/15425-2) localizada na região de Botucatu, SP. Foram realizadas coletas em dois momentos (estações de inverno e verão), em cinco pontos contemplando: uma sala de ordenha, três bebedouros dos animais e um açude conforme ilustrado na Figura 4.

Também foram coletadas amostras das fezes de bezerros (n=30) e moscas (n=30) em cada estação, conforme especificado no item 3.1.3.

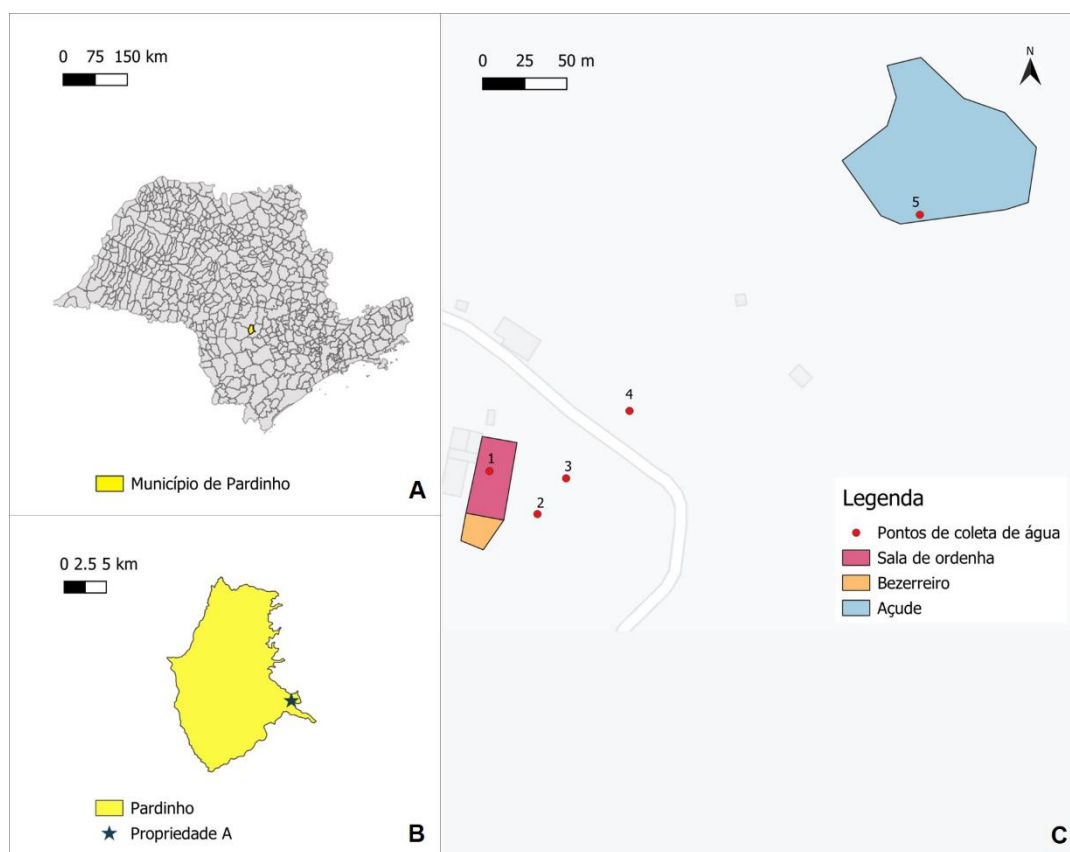


Figura 4. Localização dos pontos de coleta. A. Localização do município de Pardinópolis no estado de São Paulo. B. Localização da propriedade leiteira. C. Área da propriedade com os pontos de coleta. 1: sala de ordenha; 2, 3 e 4: bebedouros dos animais; 5: açude. Mapas elaborados com o *software* QGIS 3.32.0.

3.1.3. Coleta de amostras, isolamento e identificação de *E. coli*

Água. Em cada ponto foram coletadas cerca de 300 mL de água em frascos estéreis, mantidos sob refrigeração até o processamento. As amostras de água foram testadas quanto à presença de coliformes fecais por meio da técnica da membrana filtrante, na qual o

volume de 100 mL de cada amostra de água foi filtrado em membrana de celulose com porosidade de 0,45 µm, posteriormente a membrana foi colocada sobre a superfície de uma placa de Petri contendo ágar MacConkey com e sem adição de tetraciclina (50 µg/mL) e incubadas a 37°C por 24 horas. A tetraciclina foi adicionada a fim de selecionar as cepas resistentes a esse antimicrobiano devido aos resultados anteriores terem indicado alguma associação entre a resistência a tetraciclina e a transferência de integron de classe 1 por conjugação (Alves 2017).

Fezes. As amostras fecais dos bezerros foram colhidas diretamente da ampola retal dos animais e armazenadas em meio de transporte Stuart. Posteriormente foram semeadas por esgotamento em placas de ágar MacConkey, conforme exposto no tópico anterior.

Moscas. As moscas foram coletadas nos arredores da ordenha e do bezerreiro, utilizando um puçá entomológico de tela fina, previamente higienizado em solução de hipoclorito de sódio 10% por 30 minutos. As moscas capturadas foram transferidas para tubos identificados diretamente do puçá e inativadas por congelamento a -20 °C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 2 mL de caldo EC e incubados a 37 °C por 24h, posteriormente foram semeados em meio ágar MacConkey, conforme exposto no tópico anterior.

As colônias características de *E. coli* foram confirmadas por diferenciação bioquímica utilizando os meios EPM/MILi/Citrato (Toledo et al., 1982a, 1982b) e estocadas em foram estocadas em ágar semissólido (ágar nutriente 1,15%; caldo nutritivo 0,4%).

3.2. CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

3.2.1. Sensibilidade a antimicrobianos (antibiograma)

O perfil de sensibilidade microbiana dos isolados foi verificado por meio da técnica de difusão com discos, utilizando ágar Mueller Hinton e suspensão bacteriana em solução salina (NaCl 0,8%) na escala 0,5 de Mc Farland (Bauer et al. 1966) e os seguintes antimicrobianos: ampicilina (10µg), amoxicilina/ácido clavulânico (30µg), cefalexina (30µg), cefoperazona sódica (75µg), ceftiofur (30µg), ceftriaxona (30µg), cloranfenicol (30µg), enrofloxacina (5µg), ciprofloxacina (5µg) gentamicina (10µg), sulfametoxazole/trimetoprim (25µg) e tetraciclina (30µg) (Ribeiro 2008; Winn Jr. et al. 2008). A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de sensibilidade e os resultados foram interpretados conforme as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI 2020a, 2020b). Os

perfis intermediários foram considerados como resistentes para fins de contabilização e as cepas multirresistentes (MDR) as resistentes a três classes de antimicrobianos ou mais (Magiorakos et al. 2012).

3.2.2. Produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) – Método da aproximação de disco

A detecção de ESBL foi realizada conforme o método de aproximação de discos (Jarlier et al. 1988), utilizando discos de aztreonam (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg) e amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg).

3.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a detecção dos genes de resistência, virulência e integrons e demais abordagens baseadas em PCR foram utilizadas as metodologias descritas a seguir.

3.3.1. Extração de DNA (método de choque térmico)

O DNA total dos isolados foi extraído a partir da cultura confluenta em placas de ágar tripton de soja (TSA) dissolvida em 200 µL de água ultrapura estéril, fervida em banho-maria por 10 minutos e em seguida congelada a -20°C por 30 minutos. Posteriormente, as amostras em temperatura ambiente foram centrifugadas a 12.000 rpm (9.676,8 g) (centrífuga Sorvall® MC12) por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo e estocado a -20 °C. Alíquotas para uso foram mantidas sob refrigeração (Chapman et al. 2001).

3.3.2. PCR

A detecção dos genes de interesse (Tabela 2) foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), primeiramente utilizando DNA presente em um *pool* de cinco amostras². Em cada reação foi adicionado 1,5 U *Taq* polimerase, 1,5 µL de Tampão 10X para PCR, 200 µM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0,5 µL dos iniciadores em concentrações ótimas, água MiliQ estéril q.s.p., em um volume final de 15 µL e 2 µL de DNA. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose em tampão TAE (Tris 2 M; Ácido acético 0,04 M; EDTA 0,01 M em pH 8,0). O gel foi preparado utilizando tampão TAE e GelRed™ (Biotium) na concentração indicada pelo fabricante para a visualização das bandas em transiluminador de luz UV. Utilizou-se marcadores de peso molecular de 50 pb, 100 pb e 1 kb para conferência do tamanho dos produtos obtidos. Quando necessário as imagens foram registradas com o sistema Image Master® VDS (Pharmacia Biotech).

² Os resultados positivos foram repetidos para a amostra de DNA de cada bactéria contida no *pool*.

A programação das PCRs para a detecção dos genes listados na Tabela 2 (termociclador Techne TC-312) foi a seguinte: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, 30 ciclos (94°C por 45 segundos, temperatura de anelamento por 45 segundos, 72°C por 45 segundos) e extensão final a 72°C por sete minutos.

Para as metodologias baseadas em PCR descritas nos próximos itens o protocolo utilizado para as reações foi o mesmo, com adaptações para as PCRs multiplex em que foi preparado um *mix* dos iniciadores conforme indicado nas referências e 1 µL da mistura foi adicionado na reação. Igualmente, as programações das PCRs seguiram as metodologias descritas nas respectivas referências.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para a detecção dos fatores de virulência, genes de resistência e integrons.

Iniciador		Sequência (5'-3')	T°C	pb	Ref.
Fatores de virulência					
<i>eae</i>	intimina	GACCCGGGCACAAGCATAAGG CCACCTGCAGCAACAAGAGC	63	384	(Yu e Kaper 1992)
<i>stx1</i>	verotoxina	AAGTTGCAGCTCTCTTTGAATA TGCAAACAAATTATCCCCTGAG	50	364	(Ojeniyi et al. 1994)
<i>stx2</i>	verotoxina	GGGCAGTTATTTTGCTGTGGA GTATCTGCCTGAAGCGTAA	50	386	
<i>ehxA</i>	enterohemolisina A	GCATCATCAAGCGTACGTTCC AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	55	534	(Paton e Paton 1998)
<i>saa</i>	adesina autoaglutinante	CGTGATGAACAGGCTATTGC ATGGACATGCCTGTGGCAAC	59	119	(Paton e Paton 2002)
<i>hes</i>	hemaglutinina de STEC	GGTTGTTTTCTGGTGAAC AACCAGCGTCTTATCGAT	63	350	(Vélez et al. 2021)
β-lactâmicos					
<i>bla_{TEM}</i>	ESBL	TCGGGGAAATGTCGCG TGCTTAATCAGTGAGGCACC	61	972	(Cao et al. 2002)
<i>bla_{SHV}</i>	ESBL	TTATCTCCCTGTTTAGCCACC GATTGCTGATTTTCGCTCGG	61	795	
<i>bla_{CTX-M}</i>	ESBL	CGATGTGCAGTACCAGTAA TTAGTGACCAGAATCAGCGG	60	585	(Batchelor et al. 2005)
Tetraciclina					
<i>tetA</i>	bomba de efluxo	GTAATTCTGAGCACTGTGCGC CTGTCTGGACAACATTGCTT	62	937	(Guardabassi et al. 2000)
Integrons					
<i>intI1</i>	integrase classe 1	GGGTCAAGGATCTGGATTTCG ACATGGGTGTAAATCATCGTC	62	483	(Mazel et al. 2000)
5'CS 3'CS	região dos cassetes	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA	60	V	(Lévesque et al. 1995)
<i>intI2</i>	integrase classe 2	CACGGATATGCGACAAAAAGGT GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	62	788	(Mazel et al. 2000)
<i>attI2</i> <i>orfX</i>	região dos cassetes	GACGGCATGCACGATTTGTA GATGCCATCGCAAGTACGAG	58	V	(Machado et al. 2005)
<i>dfrA7/dfrA17</i>	resistência a trimetoprim	CAGAAAATGGCGTAATCG TCACCTTCAACCTCAACG	55	345	(Frech et al. 2003)

T°C: Temperatura de anelamento; pb: tamanho do produto em pares de bases; Ref.: Referência; V: variável

3.4. PESQUISA DA RESISTÊNCIA À POLIMIXINA

3.4.1. Triagem de *E. coli* resistentes à polimixina

Os 877 isolados da primeira coleta foram semeados em ágar MacConkey contendo polimixina B (2 µg/mL) (Fernandes et al. 2016b) e incubadas a 37 °C por 24h. As cepas que apresentaram crescimento foram inoculadas novamente nas mesmas condições por mais duas vezes com a finalidade de excluir cepas falso resistentes.

3.4.2. Detecção dos genes *mcr*

As cepas que apresentaram resistência fenotípica a polimixina B (item 3.4.1) foram investigadas quanto a presença dos genes *mcr* usando PCR conforme descrito no item 3.3.2 e as especificações de cada referência. Os genes investigados foram *mcr-1* ao *mcr-5* (Rebelo et al. 2018) e *mcr-6* ao *mcr-10* (Xu et al. 2021).

3.4.3. Sequenciamento *Sanger*

As amostras positivas foram confirmadas por meio do sequenciamento *Sanger* do produto de PCR. O volume de 5 µL do produto de cada amostra foi purificado utilizando 2 µL de enzima ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific) diluída em água ultrapura estéril na razão 1:2. A reação foi incubada a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, a 80 °C por 15 minutos. As amostras foram diluídas e aliquotadas para envio conforme especificações do laboratório prestador de serviço.

As sequências foram visualizadas e montadas com o auxílio do *software* Sequencher 4.7 (Gene Codes Corporation) e analisadas utilizando as ferramentas BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e ORF *Finder* (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>).

3.4.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As amostras que apresentaram genes de resistência *mcr* foram avaliadas quanto a CIM de polimixina B utilizando micro diluição em placa de 96 poços em meio líquido Mueller Hinton e as concentrações finais de polimixina entre 1 a 16 µg/mL na razão 1:2 conforme protocolo do CLSI (CLSI 2012).

3.5. CARACTERIZAÇÃO DOS INTEGRONS

As amostras que apresentaram resultado positivo para integrons – amplificação da integrase (*intI1* e/ou *intI2*) e da região variável de inserção dos cassetes de genes (5'CS;3'CS e/ou *attI2*;*orfX*) – tiveram o produto de PCR da região variável sequenciada para a detecção dos genes de resistência presentes no integron. O preparo das amostras para sequenciamento foi realizado conforme o descrito no item 3.4.3.

3.6. CARACTERIZAÇÃO DOS PLASMÍDEOS E CONJUGAÇÃO

3.6.1. Perfil plasmidial por *PCR-Based Replicon Typing* (PBRT)

As cepas que apresentarem integrons e genes *mcr* foram classificadas quanto a tipagem plasmidial em grupos de incompatibilidade (Inc/Rep), utilizando a metodologia baseada em PCR proposta por (Carattoli et al. 2005). As reações foram preparadas conforme o item 3.3.2 e as especificações da referência.

3.6.2. Ensaio de conjugação

A capacidade de transferência dos integrons e dos genes *mcr* foi avaliada por meio de ensaios de conjugação. As cepas que apresentaram resultado positivo na PCR para os integrons e/ou *mcr* foram utilizadas como doadoras para o ensaio de conjugação e como receptora, a cepa de *E. coli* J53 resistente a azida sódica (J53 Az^R). O ensaio foi realizado conforme descrito por (Soufi et al. 2009) com modificações (Alves 2017).

Tetraciclina foi escolhida para a seleção das cepas transconjugantes, devido à resistência geralmente ser mediada por plasmídeos (Chopra e Roberts 2001) o que fornece um controle mais robusto para o ensaio, uma vez que os integrons podem estar localizados no cromossomo bacteriano e a utilização de sulfonamidas (resistência intrínseca do integron) para a seleção das transconjugantes não ofereceria controle sobre a execução do ensaio.

Uma colônia de cada cepa doadora e da receptora foi cultivada individualmente em 2 mL de caldo LB (triptona 10%; extrato de levedura 5%; NaCl 10% w/v) a 37 °C por 18 horas. Posteriormente, alíquotas das culturas das cepas doadoras e receptora, foram transferidas para um mesmo tubo na razão 1:10 (v/v) e incubadas a 37 °C por 18 horas sem agitação. No próximo passo, 100 µL das culturas contendo doadora + receptora foram semeadas em placas de ágar Mueller Hinton contendo azida sódica (100 µg/mL), tetraciclina (100 µg/mL) e azida sódica combinada com tetraciclina (100 µg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C por até 72 horas para a visualização das colônias transconjugantes.

Uma colônia transconjugante representante de cada amostra foi repicada em LB e ágar Mueller Hinton contendo azida sódica e tetraciclina a 100 µg/mL para verificação da resistência fenotípica aos antimicrobianos e genes transferidos (itens 3.2 e 3.3).

Para o ensaio de conjugação para as cepas positivas para *mcr* foi utilizada polimixina B (4 µg/mL) como antimicrobiano de seleção.

3.7. PESQUISAS RELACIONADAS À VIRULÊNCIA

3.7.1. Classificação filogenética de *E. coli*

As cepas de *E. coli* positivas para integron, *mcr* e STECs foram atribuídas aos grupos filogenéticos A, B1, B2, C, D, E, F utilizando do esquema proposto por Clermont et al. (2013) por meio de quatro reações de PCR Multiplex e duas reações simples. As reações foram preparadas conforme o item 3.3.2 e as especificações da referência.

3.7.2. Produção de biofilme

As cepas positivas para integron e as STECs foram testadas quanto à produção de biofilme por meio do cultivo em 200 µL de caldo infusão cérebro-coração (*Brain Heart Infusion Broth* - BHI) em placas de 96 poços a 37 °C *overnight* sem agitação. Posteriormente, o meio foi descartado e a placa foi lavada por imersão em água destilada por quatro vezes. Após a secagem da placa, foram adicionados 230 µL do corante cristal violeta 0,5%. A placa permaneceu em repouso por 10 minutos e em seguida foi executada a lavagem em água destilada por mais quatro vezes. Para a leitura da absorbância a 570 nm foram adicionados 200 µL de álcool etílico absoluto (O'Toole 2011). Os biofilmes foram classificados em forte, moderado, fraco ou negativo conforme o proposto por (Sheikh et al. 2001). Como controle para formação de biofilme foi usada a cepa de *E. coli* K12 C600 (biofilme forte) e para ausência de biofilme apenas o meio de cultura BHI.

3.7.3. Caracterização das cepas de *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC)

Detecção de toxina Shiga em ensaio *in vitro*

As cepas positivas para os genes *stx1* e/ou *stx2* foram testadas quanto à produção de toxina Shiga em ensaio de citotoxicidade utilizando células Vero (Células de Rim de Macaco Verde Africano) (Konowalchuk et al. 1977).

Preparo da toxina

As cepas selecionadas foram cultivadas em 2 mL de caldo Triptona de Soja (TSB) a 37 °C sob agitação de 250 rpm *overnight* e posteriormente centrifugadas a 12000 rpm (9676,8 g) por 10 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados (toxina) em membrana de 0,22 µm estéril e armazenados a -20°C.

Preparo das células Vero

As células foram cultivadas em Meio Mínimo Essencial Eagle (MEM), com adição de 10% de soro fetal bovino, 100 UI de penicilina/mL e 10 mg/mL de estreptomicina e incubadas a 37°C em estufa de CO₂ (5%) para a formação de monocamada celular.

Posteriormente, 100 µL de MEM contendo aproximadamente 10⁴ células/mL foram transferidas para placas de 96 poços com fundo chato e incubadas a 37°C em estufa de CO₂ a 5% por 24 horas.

Ensaio de citotoxicidade

A partir da cultura das células descrita no item anterior, o meio de cultivo das células foi removido e as células foram lavadas duas vezes com 150 µL de Salina tamponada com Fosfato (PBS). Os sobrenadantes filtrados (toxinas) foram diluídos a 1:16 em MEM sem soro fetal bovino e 100 µL foi adicionado às células em triplicatas e incubadas 37°C em estufa de CO₂. A leitura foi realizada nos intervalos de 24, 48 e 72 horas de incubação. Os poços onde as células que apresentaram alterações morfológicas, típicas do efeito citotóxico causado por toxina Shiga, foram considerados positivos. Como controles positivos foram usadas as cepas de *E. coli* O157:H7 e H30 e como controles negativos sobrenadante da cepa de *E. coli* K12 e o meio TSB diluídos na mesma razão.

Sorotipagem

As cepas positivas para *stx1* e/ou *stx2* com perfis fenotípicos de sensibilidade antimicrobiana distintos, foram selecionadas para a determinação do sorotipo (antígenos “O” e “H”) (Blanco e Blanco 1993).

Determinação dos sorogrupos “O”

Preparo de antígenos “O”

Inicialmente as amostras foram semeadas em Ágar MacConkey e incubadas a 37 °C por 24 horas. No segundo dia, uma colônia foi repicada em meio Ágar Triptona de Soja (TSA) nas mesmas condições de incubação para obtenção de crescimento confluyente. No terceiro dia, foi preparada uma suspensão dessas bactérias equivalente ao tubo nº6 da escala de McFarland (18×10^8 UFC) em tubos contendo 5 mL de salina (NaCl 0,15M), adicionada de azida sódica 0,01%. A suspensão foi fervida em banho-maria a 100°C por 1 hora e, após esse tempo, foram adicionados 5 mL de salina 0,15M adicionada de formol 0,5% e cristal violeta 0,005%. Nenhuma bactéria foi considerada rugosa (autoaglutinação).

Diluição dos soros

Para a execução dos testes foram selecionados os soros relacionados à STEC mais frequentes em bovinos. Os soros foram previamente titulados utilizando antígenos padrões (preparados da mesma forma que a suspensão de bactérias descrita no item anterior) e, aqueles que apresentaram um título maior do que 1:640 foram organizados em *pools*. Os soros que tiveram a titulação positiva menor do que 1:640 foram testados individualmente (Tabela 3). Em todo o processo de determinação dos sorogrupos, foi utilizada a diluição 1:80.

Tabela 3. Conjunto dos antissoros anti-O de *E. coli* utilizados nos ensaios de aglutinação. Conjunto dos antissoros anti-O de *E. coli* utilizados nos ensaios de aglutinação.

<i>Pool</i>	Soros presentes no <i>pool</i>
1	O2, O5, O41, O91, O109
2	O4, O6, O16, O39, O136
3	O82, O103, O105, O153, O157
4	O7, O23, O123
Individuais	O22, O26, O46, O74, O89, O111, O113, O118, O126, O146, O163, O168, O177

Teste de aglutinação do antígeno “O”

As suspensões de bactérias foram testadas frente aos *pools* de soros com diluição 1:80 em placas de microdiluição com fundo V, colocando-se 50 µL da suspensão de antígenos previamente preparada e 50 µL do *pool* a ser testado. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Em casos de resultado positivo, os soros contidos no *pool* foram testados individualmente. Em casos de resultados positivos a mais de um soro, o antígeno bacteriano foi testado frente a diluições seriadas dos soros, considerando como resultado aquele que se equiparasse a diluição previamente estabelecida com as titulações dos antígenos padrão (menor diluição efetiva). Como controle positivo foram utilizados os antígenos padrões e como controle negativo, salina fisiológica.

Determinação dos sorogrupos “H”

As cepas que tiveram o sorogrupo “O” identificado foram selecionadas para a determinação do sorogrupo “H”.

Preparo de antígenos “H”

As amostras foram semeadas em Ágar MacConkey e incubadas a 37 °C por 24h. Dessa placa, três colônias foram selecionadas e semeadas em meio MILi (Toledo et al. 1982b), sem adição de lisina, em tubo reto e incubadas a 37 °C. As amostras que apresentaram motilidade positiva após 24h foram semeadas em meio MILi preparados em tubo “U” e incubadas a 37 °C por 18h para a ativação da motilidade. Foram realizados cinco repiques em tubo “U” sempre a partir da extremidade oposta da sementeira.

Após a ativação da motilidade, as amostras foram semeadas em um tubo contendo 10 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), utilizando alça de inoculação espiral em *loop*, e incubada sob agitação de 80 rpm, a 37 °C por aproximadamente 3h ou até se obter uma suspensão equivalente ao tubo nº 4 (12×10^8 UFC) da escala de Mc Farland. A esse tubo foi então acrescentado 10 mL de solução de NaCl 0,15M acrescida de 0,5% de formalina, sendo a suspensão final equivalente ao tubo nº 2 (6×10^8 UFC) da escala de Mc Farland. A suspensão antigênica foi mantida em temperatura ambiente por 24h e posteriormente armazenada em geladeira. As cepas que não se mostraram móveis no meio MILi em tubo reto, foram descartadas. As cepas que demoraram mais que 24h para chegar à outra extremidade do tubo U foram repicadas de 6 a 7 vezes até que fossem capazes de atravessar o tubo U em 24h ou menos.

Diluição dos soros anti “H”

Os soros já haviam sido previamente testados em diversas concentrações e combinações para formação de *pools* em trabalhos previamente descritos (Blanco e Blanco 1993). Em todo o processo de determinação dos sorogrupos, foi utilizada a diluição de 1:200 e inicialmente os *pools* apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Conjunto dos antissoros anti-H de *E. coli* utilizados nos ensaios de aglutinação. Conjunto dos antissoros anti-H de *E. coli* utilizados nos ensaios de aglutinação.

<i>Pool</i>	Antissoros presentes (H)
1	H2, H7, H11, H16, H19
2	H1, H3, H4, H5, H6
3	H8, H9, H10, H12, H14
4	H15, H17, H18, H20, 21
5	H39, H49, H53

Teste de aglutinação do antígeno “H”

Para a execução do teste foram adicionados a um tubo de vidro de pequeno calibre (12x75mm) 500 µL da solução previamente preparada de antígeno e 500 µL do *pool* ou soro individual a ser testado. Os tubos foram incubados em banho-maria a 45 °C por 3h. Em casos de resultado positivo para o *pool* (aglutinação), o antígeno foi testado individualmente para todos os soros presentes no *pool*. Como controle positivo, foram utilizados os antígenos padrão e como controle negativo, solução de NaCl 0,15M. Todas as amostras positivas foram testadas em duplicata.

Deteção de genes relacionados à virulência em STEC

As cepas positivas para *stx1* e/ou *stx2* foram investigadas quanto aos genes de virulência listados na Tabela 1 por PCR conforme descrito no item 3.3.2.

3.8. PERFIL CLONAL DAS CEPAS

3.8.1. *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE)

As cepas de *E. coli* positivas para integron, *mcr* e algumas STECs representativas do conjunto de amostras caracterizado foram selecionadas para a avaliação do perfil clonal.

A técnica de PFGE foi realizada conforme o protocolo padronizado para a rede PulseNet (Ribot et al. 2006), utilizando a enzima *XbaI* (Thermo Fisher Scientific). Após a digestão cerca de 1/3 dos blocos (*plugs*) foram transferidos para gel de agarose (PFGE Bio-Rad) preparados a 1%. O gel foi submetido à eletroforese em TBE 0,5X realizada em equipamento CHEF-DR III (Bio-Rad) a 6 V e ângulo de 120° com tempo de pulso inicial de 2,2 segundos e final de 54,2 segundos, por 19 horas. Posteriormente, o gel foi incubado em solução de Brometo de Etídeo a 1 µg/mL por 30 minutos e descorado em água ultrapura por 30 minutos para a remoção do “fundo” gerado pelo Brometo de Etídeo. O gel foi fotografado e a imagem capturada pelo sistema Image Master® VDS (Pharmacia Biotech).

As fotos dos géis foram analisadas com o programa GelComparII 5.1 (Applied Mayhs) utilizando o método *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average* (UPGMA), utilizando coeficiente de Dice com tolerância e otimização de 1%.

3.8.2. Sequenciamento de genoma completo (WGS)

Doze cepas de *E. coli* isoladas da primeira coleta foram selecionadas para o sequenciamento do genoma completo considerando o local de origem (propriedade), fonte de isolamento (animal), presença de integron, genes *mcr* e *stx1* ou *stx2* com efeito citotóxico em células Vero, a saber: MA17a e MA17b (*Musca domestica*, Propriedade A), MA26a e MA26b (*Fannia* sp., Propriedade A), BA15d, BA37e, BA57c e BA57d (bezerros, Propriedade A), CAO4d (cão, Propriedade A), BB1d, BB8c e BB6d (bezerros, Propriedade B).

O sequenciamento foi realizado pelo laboratório prestador de serviços LaCTAD (Life Sciences Core Facility) localizado na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), usando plataforma Illumina MiSEQ com 2x300 *paired-end reads* (NCBI BioProject PRJNA867362).

A qualidade dos *reads* foi verificada usando FastQC 0.11.4 (Andrews 2010) e aparadas com o *software* Trimmomatic 0.39 (Bolger et al. 2014). A montagem dos genomas (*draft genome*) foi realizada com SPAdes 3.9 (Bankevich et al. 2012) e os plasmídeos com plasmidSPAdes (Antipov et al. 2016). A anotação dos genomas foi realizada utilizando a plataforma *web* PATRIC (<https://www.bv-brc.org/>) (Wattam et al. 2017). Do *Center for*

Genomic Epidemiology services (CGE) (<https://cge.food.dtu.dk/services>) foram utilizadas as ferramentas ResFinder 4.1, VirulenceFinder 2.0, MLST 2.0³, SerotypeFinder 2.0, PlasmidFinder 2.1, MobileElementFinder. A plataforma *Proksee tools* (<https://proksee.ca/>) (Grant et al. 2023) foi utilizada para a visualização dos genomas e/plasmídeos para acesso às ferramentas Prokka, Alien Hunter, mobileOG-db e Phigaro. BLAST e ORF *Finder* foram utilizados como complemento das análises quando necessário. Adicionalmente, o grupo filogenético foi verificado utilizando o genoma na plataforma ClermontTyping (<http://clermonttyping.iame-research.center/>) (Beghain et al. 2018).

A filogenia molecular das cepas selecionadas foi realizada na plataforma PATRIC utilizando a cepa de *E. coli* K12 ER3445 (GenBank CP010441.1) como genoma de referência. Foi utilizada a abordagem de *core genome* MLST (cgMLST) com as sequências de 1000 genes, zero deleção e zero duplicação. Os alinhamentos foram realizados pelo *software* Mafft (Kuraku et al. 2013). A árvore foi inferida pelo critério da máxima verossimilhança utilizando o *software* RAxML (Stamatakis 2006). Relatório de saída com os parâmetros e os genes utilizados podem ser conferidos no Anexo B.

3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste Exato de Fisher foi utilizado para a associação entre a presença/ausência de: multirresistência e integron de classe 1, resistência a polimixina e multirresistência, STEC e multirresistência, STEC e resistência a polimixina, STEC e integron.

As comparações entre a resistência antimicrobiana encontrada entre os grupos de estudo (moscas, bezerros, vacas, mulas, éguas, cães, cordeiros e carneiro) foram realizadas com o teste Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn e as comparações referentes aos isolados de inverno e verão pelo teste de Kruskal-Wallis.

O nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes. Os testes foram executados no programa BioEstat 5.3 (Instituto Mamirauá) (Ayres et al. 2007).

³ Esquemas: #1 descrito por (Wirth et al. 2006) é o mais utilizado e não será referido em cada resultado; #2 descrito por (Jaureguy et al. 2008) será indicado no resultado quando utilizado.

IV - Resultados

PARTE 1

4.1. Resistência antimicrobiana em *E. coli* isoladas da microbiota intestinal de bovinos, caninos, equinos, ovinos e de amostras de água

4.1.1. Isolamento de *E. coli* nos períodos de inverno e verão

No período do inverno (agosto de 2019) e verão (dezembro de 2019) foram coletadas amostras de fezes de 30 bezerros, diretamente da ampola retal, 30 moscas foram capturadas no ambiente de ordenha e amostras de água foram coletadas no interior da propriedade, contemplando cinco pontos – açude, sala de ordenha (poço) e três bebedouros dos animais (Figura 1). Os resultados a seguir consideram os isolados que cresceram em ágar MacConkey com tetraciclina (50µg/mL).

Das amostras do inverno foram isoladas 102 *E. coli* das fezes de bezerros, 35 da superfície externa de moscas (Diptera: Muscomorpha) e 11 de água (duas isoladas da amostra do açude e nove dos três bebedouros). Das amostras do verão foram isoladas 142 *E. coli* de bezerros, 69 de moscas (Diptera: Muscomorpha) e 20 de água (cinco de cada ponto exceto sala de ordenha).

As amostras de água coletadas da sala de ordenha (poço) não apresentaram crescimento bacteriano em nenhuma das duas coletas.

4.1.2. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

Apesar de o isolamento ter sido realizado em meio com adição de ampicilina (item 1.1), as cepas não apresentaram 100% de resistência a ampicilina (10 µg) com o método de difusão com discos, de modo que a concentração do antimicrobiano escolhida para a seleção pode ter sido insuficiente ou se perdido devido ao estresse metabólico gerado às cepas no procedimento de estoque. Apesar de em menor proporção, o mesmo ocorreu para as cepas isoladas no inverno e verão sob a pressão de tetraciclina.

Propriedade A (2015): foram realizados os antibiogramas das 284 *E. coli* isoladas de bezerros, 240 de vacas, dez de éguas, 15 de mulas e 25 de cachorros, sendo que 25 cepas de bezerros (8,8%) e seis de cachorros (24%) apresentaram multirresistência. Nenhuma cepa isolada das vacas, éguas e mulas apresentaram multirresistência. Das 25 cepas multirresistentes isoladas dos bezerros, dez foram resistentes a três classes de antimicrobianos, duas a quatro classes e 13 a cinco classes. Das seis cepas multirresistentes

isoladas de cachorros, quatro apresentaram resistência a quatro classes de antimicrobianos e duas a cinco classes.

Os antimicrobianos que apresentaram maior frequência de cepas de *E. coli* resistentes foram diferentes entre os animais. Para os isolados de bezerros, tetraciclina foi o antimicrobiano de maior frequência e entre os isolados de vacas e éguas, cefalexina, e entre os isolados dos cães tetraciclina e ampicilina (Tabela 5).

Propriedade B (2015): foram realizados os antibiogramas de 50 *E. coli* isoladas de bezerros, 40 de vacas, cinco de carneiro e dez de cordeiros, sendo que sete cepas de bezerros e quatro cepas de vacas apresentaram multirresistência. Das sete cepas multirresistentes isoladas dos bezerros (14%), duas apresentaram resistência a três classes de antimicrobianos, três a quatro classes e duas a cinco classes, e das quatro isoladas de vacas (10%), uma apresentou resistência a quatro classes de antimicrobianos e três a cinco classes. Os isolados de bezerros apresentaram maior frequência de resistência à tetraciclina (Tabela 5).

Propriedade A (inverno e verão): foram realizados os antibiogramas das *E. coli* isoladas da superfície externa das moscas e das amostras de água. Das 35 cepas isoladas de moscas no inverno, 23 apresentaram multirresistência (65,71%), sendo cinco resistentes a três classes de antimicrobianos, quatro cepas a quatro classes e 14 a cinco classes de antimicrobianos. Já os antibiogramas das 69 cepas isoladas de moscas no verão mostraram 30 cepas multirresistentes (43,48%), sendo 23 cepas resistentes a três classes de antimicrobianos, cinco cepas a quatro classes e duas a cinco classes.

Das 11 cepas isoladas das amostras de água no inverno, três foram multirresistentes, sendo uma resistente a três classes, uma a quatro classes e uma a cinco classes. E das 20 cepas das amostras de água coletadas no verão, quatro foram multirresistentes, sendo uma resistente a três classes de antimicrobianos e três a quatro classes.

Excluindo a tetraciclina, as cepas isoladas de moscas no inverno apresentaram maior frequência de resistência aos antimicrobianos, ampicilina, enrofloxacina, cloranfenicol e sulfametoxazol/trimetoprim, e as isoladas no verão, os antimicrobianos ampicilina e amoxicilina/ácido clavulânico (Figura 5). As cepas isoladas de amostras de água apresentaram maior frequência de resistência aos antimicrobianos, ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico e cloranfenicol similarmente para as coletas de inverno e verão (Figura 6).

Tabela 5. Frequência relativa de *Escherichia coli* resistentes* isoladas de fezes de bovinos, caninos, equinos e ovinos em duas propriedades leiteiras da região de Botucatu, SP (2015).

	Antimicrobianos e n (%)											
	AMP	AMC	CFE	CRO	CFP	CTF	CIP	ENR	CLO	SUT	GEN	TET
Prop. A (n)												
Bezerros (284)	26 (9,1)	27 (9,5)	14 (4,9)	7 (2,5)	10 (3,5)	8 (2,8)	17 (6)	22 (7,7)	6 (2,1)	26 (9,1)	16 (5,6)	53 (18,7)
Vacas (240)	13 (5,4)	8 (3,3)	35 (14,6)	2 (0,8)	2 (0,8)	2 (0,8)	0	4 (1,7)	0	0	0	4 (1,7)
Mulas (15)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Éguas (10)	1 (10)	1 (10)	3 (30)	0	0	0	1 (10)	1 (10)	0	0	0	0
Cães (25)	8 (32)	4 (16)	2 (8)	0	1 (4)	2 (8)	3 (12)	6 (24)	4 (16)	6 (24)	0	9 (36)
Prop. B (n)												
Bezerros (50)	13 (26)	6 (12)	9 (18)	3 (6)	3 (6)	2 (4)	9 (18)	8 (16)	8 (16)	6 (12)	0	16 (32)
Vacas (40)	6 (15)	4 (10)	3 (7,5)	2 (5)	4 (10)	2 (5)	4 (10)	6 (15)	4 (10)	4 (10)	1 (2,5)	3 (7,5)
Carneiro (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cordeiros (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (10)	1 (10)

n: número de cepas resistentes; Prop.: Propriedades; AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; CFE: cefalexina; CRO: ceftriaxona; CFP: cefoperazona; CTF: ceftiofur; CIP: ciprofloxacina; ENR: enrofloxacina; CLO: cloranfenicol; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina.

*Perfil intermediário foi considerado como resistente.

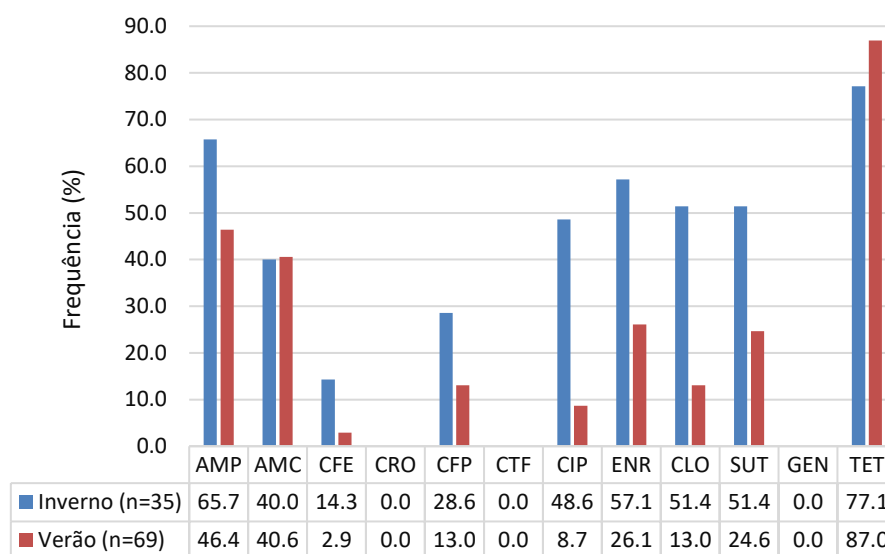


Figura 5. Frequência relativa da resistência aos antimicrobianos de *E. coli* isoladas da superfície externa de moscas coletadas na propriedade A nos períodos de inverno e verão (Botucatu-SP, 2019). AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; CFE: cefalexina; CRO: ceftriaxona; CFP: cefoperazona; CTF: ceftiofur; CIP: ciprofloxacina; ENR: enrofloxacin; CLO: cloranfenicol; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina.

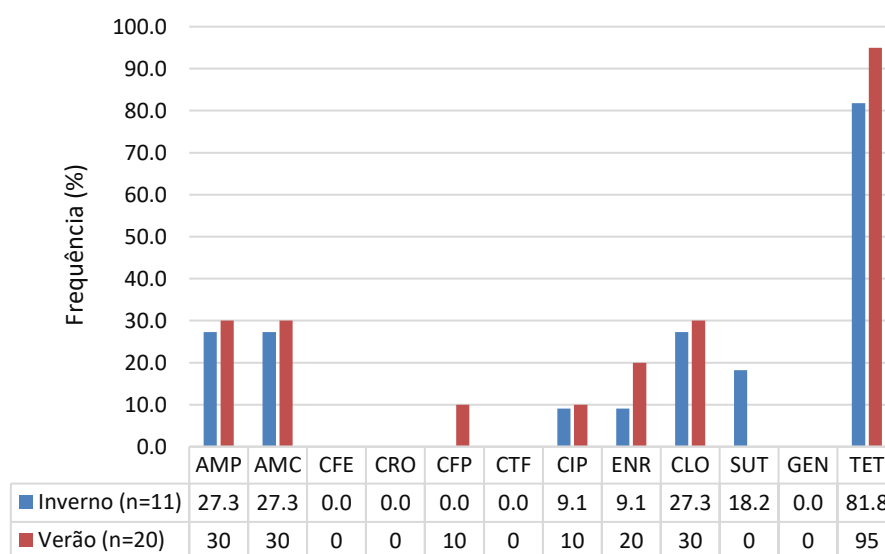


Figura 6. Frequência relativa da resistência aos antimicrobianos de *E. coli* isoladas de amostras de água coletadas na propriedade A nos períodos de inverno e verão (Botucatu-SP, 2019).

AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; CFE: cefalexina; CRO: ceftriaxona; CFP: cefoperazona; CTF: ceftiofur; CIP: ciprofloxacina; ENR: enrofloxacin; CLO: cloranfenicol; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina.

As cepas que apresentaram resistência fenotípica as cefalosporinas de terceira geração foram submetidas ao teste de aproximação com discos para a detecção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) (Figura 7).

Na Propriedade A, os isolados dos bezerros apresentaram resultado positivo para ceftazidima e aztreonam (8/11) e ceftriaxona e cefotaxima (2/11). Dois isolados de vacas com resistência a cefalosporinas de terceira geração foram positivos para os quatro antimicrobianos do teste. Na propriedade B, quatro isolados dos bezerros e dois de vacas selecionados para o teste apresentaram resultado positivo para ceftazidima, aztreonam, ceftriaxona e cefotaxima.

Quanto as cepas isoladas em 2019 a pesquisa de ESBL foi realizada nas cepas que apresentaram resistência fenotípica as celalosporinas de terceira geração e que foram selecionadas para os ensaios de conjugação por apresentarem integron de classe 1 (ver critério no item 4.1.8). Foram testadas cinco cepas de moscas e uma cepa de bezerro todas isoladas no inverno. As moscas exibiram resultado positivo para aztreonam (1/5), ceftazidima (1/5), cefotaxima (1/5) sendo as demais negativas para todos os antimicrobianos testados. A cepa isolada de bezerro apresentou resultado positivo para aztreonam, ceftazidima, cefotaxima.

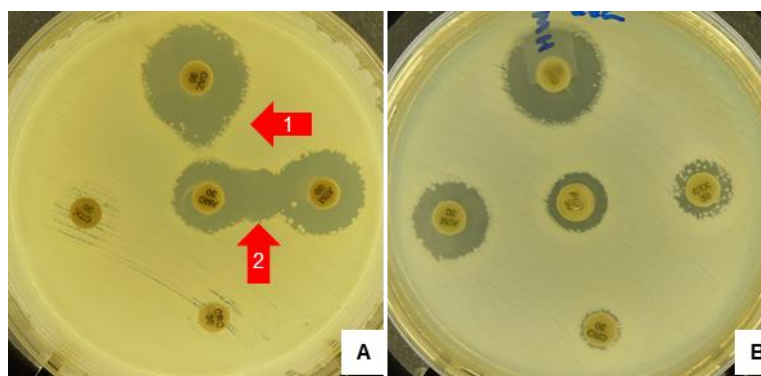


Figura 7. Teste de aproximação de disco para duas cepas de *Escherichia coli*. A. O alargamento do halo de inibição (seta 1) e o surgimento da “zona fantasma” (seta 2) indicam a produção de ESBL (beta-lactamase de espectro estendido). B. Halos de inibição inalterados indicam resultado negativo para a produção de ESBL.

4.1.3. Genes e determinantes de resistência a antimicrobianos

Os isolados da Propriedade A apresentaram genótipos positivos para os seguintes genes e região gênica:

Bezerros (n=284): *intI1* (12), CS (17), *intI1*+CS (12), *bla*_{TEM} (8), *bla*_{CTX-M} (22), *tetA* (49);

Vacas (n=240): *tetA* (5);

Cães (n=25): *bla*_{TEM} (1).

Os isolados de mulas e éguas não apresentaram nenhum dos genes de resistência testados.

Quanto à Propriedade B, os isolados apresentaram genótipos positivos para os seguintes genes e região gênica:

Bezerros (n=50): *intI1* (10), CS (10), *intI1*+CS (10), *tetA* (16);

Os isolados de vacas, carneiro e cordeiros não apresentaram nenhum dos genes testados.

Os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} não foram encontrados nas cepas da propriedade B.

Nenhum dos isolados das Propriedades A e B apresentaram integron de classe 2 e o gene *bla*_{SHV}.

Os isolados de inverno e verão obtidos de moscas, bezerros e água da propriedade A foram testados quanto a presença de integron de classe 1 e apresentaram os seguintes resultados:

Moscas inverno (n=35): *intI1* (12), CS (10), *intI1*+CS (10);

Bezerros inverno (n=102): *intI1* (3), CS (1), *intI1*+CS (1);

Moscas verão (n=69): *intI1* (1), CS (1), *intI1*+CS (1);

Bezerros verão (n=142): *intI1* (10), CS (5), *intI1*+CS (4)

As cepas que apresentaram resultado positivo para a integrase de classe 1 (*intI1*) e amplificaram a região variável (5'CS-3'CS) foram consideradas integron-positivas.

4.1.4. Análises estatísticas

Devido à baixa frequência de amostras positivas para integron em isolados de bezerros e moscas em relação às testadas, o teste Exato de Fisher não foi executável, de modo que não foi possível determinar se a presença/ausência de integron estaria relacionada a multirresistência.

O teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferença significativa entre as frequências de resistência a antimicrobianos entre as amostras coletadas no inverno e no verão, tanto para os isolados de moscas quanto para os isolados de água. Também não houve diferença entre os isolados do mesmo período e origens diferentes (moscas inverno e água inverno e moscas verão e água verão).

4.1.5. Caracterização dos integrons por sequenciamento

As análises das sequências amplificadas com os primers 5'CS-3'CS para as 12 amostras positivas para integron da Propriedade A demonstraram a presença de um único cassete gênico com identidade de 100% com o gene *dfrA7* – diidrofolato redutase tipo VII que confere resistência ao antimicrobiano trimetoprim. O gene *dfrA7* presente nos 12 isolados de bezerras apresentou 549 bp seguido do sítio de recombinação 59-bp com 144 pb (GenBank OR451490 ao OR451499, duas sequências não apresentaram qualidade ótima para depósito, mas a qualidade foi suficiente para a identificação do gene usando BLAST e ORFinder.

Quanto a Propriedade B, a análise das sequências mostrou a presença de uma cópia do cassete gênico com identidade 100% com o gene *aadA1*, constituído por 792 pb que confere resistência ao antimicrobiano, estreptomicina (GenBank OR455045 ao OR455052). Igualmente às sequências da propriedade A, duas sequências não apresentaram qualidade ótima para depósito, mas a qualidade foi suficiente para a identificação do gene usando BLAST e ORFinder.

Com a finalidade de identificar a permanência do integron entre as bactérias presentes do ambiente e nos animais da Propriedade A, as cepas positivas para integron obtidas da coleta de 2019 foram testadas quanto a presença do gene *dfrA7* e todas as 16 cepas foram positivas. Adicionalmente, o sequenciamento da região 5'CS-3'CS foi realizada para identificar o cassete gênico presente no integron. Todas as cepas apresentaram *dfrA7* inserido na região variável.

4.1.6. PCR-Based Replicon Typing (PBRT)

As cepas integron positivas foram caracterizadas quanto aos grupos de incompatibilidade Inc/replicon pela técnica *PCR-Based Replicon Typing* (PBRT). Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 6. A maioria das cepas da Propriedade A apresentaram os grupos de incompatibilidade HI1, HI2, FIA, FIB, P, K e F, exceto as cepas BA37d e BA57d que não apresentaram os grupos HI1 e HI2. Na Propriedade B, os grupos mais frequentes foram N, FIA, FIB, P, K, B/O, F (6/10), sendo N, FIA, FIB, P, K, B/O presente em três cepas e N, FIA, FIB, Y, K, B/O em uma cepa. Entre as cepas integron positivas de inverno e verão, os grupos mais frequentes foram FIB, FIC, P, N, K/B/O, F (13/16) (Tabela 7).

Tabela 6. Resistência antimicrobiana, filogrupos, tipagem plasmidial, conjugação e biofilme de *Escherichia coli* positivas para integron isoladas de bezerros em duas propriedades leiteiras de Botucatu, SP (2015).

Cepa	Resistência antimicrobiana											PBRT	FG	Conj	GR	Biofilme
	AMP	AMC	CFE	CRO	CFP	CTF	CIP	ENR	CLO	SUT	GEN	TET				
BA15b												HI1, HI2, FIA, FIB, P, K, F	B1	Sim	<i>tetA</i>	Fraco
BA15d												HI1, HI2, FIA, FIB, P, K, F	A	Não	<i>bla</i> _{CTX-M}	Fraco
BA15e												HI1, HI2, FIA, FIB, P, K, F	B1	Sim	<i>tetA</i>	Fraco
BA37d												FIA, FIB, P, K, F	B1	Sim	<i>tetA</i>	Fraco
BA37e												HI1, HI2, FIA, FIB, P, K, F	B1	Sim	<i>tetA</i>	Negativo
BA39a												HI1, HI2, FIA, FIB, P, K, F	B1	Sim	<i>tetA</i>	Moderado
BA39c												HI1, HI2, FIA, FIB, P, K, F	B1	Sim	<i>tetA</i>	Fraco
BA39d												HI1, HI2, FIA, FIB, P, K, F	B1	Sim	<i>tetA</i>	Fraco
BA47b												HI1, HI2, FIA, FIB, P, K, F	D	Sim	<i>tetA</i>	Fraco
BA47c												HI1, HI2, FIA, FIB, P, K, F	B1	Não	-	Fraco
BA57c												HI1, HI2, FIA, FIB, P	B1	Sim	<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i>	Fraco
BA57d												FIA, FIB, P, K, F	B1	Sim	<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i>	Fraco
BB1a												N, FIA, FIB, P, K, B/O	B1	Não	<i>tetA</i>	Fraco
BB1b												N, FIA, FIB, P, K, B/O, F	B1	Não	<i>tetA</i>	Negativo
BB1c												N, FIA, FIB, P, K, B/O, F	B1	Sim	<i>tetA</i>	Fraco
BB1d												N, FIA, FIB, P, K, B/O, F	B1	Sim	<i>tetA</i>	Fraco
BB1e												N, FIA, FIB, Y, K, B/O	B1	Não	<i>tetA</i>	Moderado
BB8a												N, FIA, FIB, P, K, B/O	B1	Sim	<i>tetA</i>	Forte
BB8b												N, FIA, FIB, P, K, B/O, F	B1	Sim	<i>tetA</i>	Forte
BB8c												N, FIA, FIB, P, K, B/O, F	B1	Sim	<i>tetA</i>	Forte
BB8d												N, FIA, FIB, P, K, B/O	B1	Sim	<i>tetA</i>	Negativo
BB8e												N, FIA, FIB, P, K, B/O, F	B1	Sim	<i>tetA</i>	Fraco

AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; CFE: cefalexina; CRO: ceftriaxona; CFP: cefoperazona; CTF: ceftiofur; CIP: ciprofloxacina; ENR: enrofloxacin; CLO: cloranfenicol; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina; PBRT: *PCR-Based Replicon Typing*; FG: filogrupo; Conj: conjugação; GR: genes de resistência; BA: bezerro da propriedade A; BB: bezerro da propriedade B. Células pretas perfil resistente.

Tabela 7. Resistência antimicrobiana, filogrupos, tipagem plasmidial, conjugação de *Escherichia coli* positivas para integron isoladas de bezerros e moscas da Propriedade A nos períodos de inverno e verão (Botucatu – SP, 2019).

Cepa	Resistência antimicrobiana											PBRT	PG	Conj	
	AMP	AMC	CFE	CRO	CFP	CTF	CIP	ENR	CLO	SUT	GEN				TET
MV4e													FIB,FIC,P,K/B/O,F	B1	sim
BV22a													FIB,FIC,P,N,K/B/O,F	B1	sim
BV22c													FIC,P,N,K/B/O	B1	NT
BV22d													FIB,FIC,P,N,K/B/O,F	B1	sim
BV22e													FIB,FIC,P,N,K/B/O,F	B1	NT
MI5b													FIB,FIC,P,N,K/B/O,F	B1	sim
MI5c													FIB,FIC,P,N,K/B/O,F	B1	sim
MI5d													FIB,FIC,P,N,K/B/O,F	B1	sim
MI12a													FIB,FIC,P,N,K/B/O,F	B1	sim
MI12c													FIB,FIC,P,N,K/B/O,F	B1	sim
MI12d													FIB,FIC,P,N,K/B/O,F	B1	NT
MI12e													FIB,FIC,P,N,K/B/O,F	B1	NT
MI24a													FIB,FIC,P,N,K/B/O,F	B1	sim
MI24c													FIB,FIC,P,N,K/B/O,F	B1	sim
MI24e													FIB,FIC,P,N,K/B/O,F	B1	sim
BI15b													FIB,P,HI1,K,F	B2	sim

AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; CFE: cefalexina; CRO: ceftriaxona; CFP: cefoperazona; CTF: ceftiofur; CIP: ciprofloxacina; ENR: enrofloxacin; CLO: cloranfenicol; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina; PBRT: *PCR-Based Replicon Typing*; FG: filogrupo; Conj: conjugação; MV: mosca verão; BV: bezerro verão; MI: mosca inverno; BI: bezerro inverno. Células pretas perfil resistente e cinzas intermediário.

4.1.7. Classificação filogenética e formação de biofilme

Das 12 *E. coli* integron positivas da Propriedade A, dez (83,3%) foram alocadas no grupo B1, uma (8,3%) no grupo A e uma (8,3%) no grupo D. As oito cepas testadas para biofilme todas apresentaram formação fraca. As dez *E. coli* da Propriedade B foram alocadas no grupo B1 com biofilme forte (3/10), moderado (1/10), fraco (4/10) e negativo (2/10) (Tabela 6). Similarmente, a maioria das cepas de inverno e verão foram alocadas no filogrupo B1 (15/16) e uma ao filogrupo B2 (Tabela 7).

4.1.8. Ensaio de conjugação

As doze cepas de *E. coli* da Propriedade A e as 10 da Propriedade B que apresentaram integron foram utilizadas como doadoras para o ensaio de conjugação *in vitro*, uma vez que um dos objetivos propostos foi verificar a transferência desses elementos genéticos, assim como dos genes de resistência a antimicrobianos presentes nessas cepas. Para

as cepas isoladas nos períodos de inverno e verão, 12/16 foram selecionadas para a conjugação conforme os perfis de resistência a antimicrobianos distintos.

Dez cepas da Propriedade A apresentaram capacidade de conjugação, sete da Propriedade B e todas as 12 da Propriedade A coletadas no inverno e verão.

A fim de confirmar a transferência dos genes relacionados à resistência antimicrobiana, os testes fenotípicos foram repetidos para as cepas doadoras e transconjugantes, assim como as PCRs utilizando DNA total. Todas as cepas transconjugantes apresentaram integron (*intI1*+CS) e o gene *dfrA7*. Os resultados referentes às cepas doadoras e transconjugantes das Propriedades A e B estão apresentados na Tabela 8 e os resultados referentes às cepas de inverno e verão na Tabela 9.

É possível verificar que a resistência fenotípica aos antimicrobianos testados apresenta genes ligados a elementos conjugativos, uma vez que as colônias transconjugantes adquiriram perfis resistentes presentes nas doadoras (Tabela 8 e Tabela 9).

Além disso, as cepas doadoras BA57c e BA57d haviam apresentado resistência fenotípica a cefalosporinas de 3ª geração e foram testadas quanto a produção de ESBLs, exibindo resultado positivo para os antimicrobianos ceftazidima e aztreonam (cepa BA57c, Figura 8A) e aztreonam (cepa BA57d, Figura 8C). A cepa transconjugante BA57c_t apresentou resultados negativos para todos os antimicrobianos testados (Figura 8B). Já a cepa transconjugante BA57d_t apresentou resultados positivos para todos os antimicrobianos testados (Figura 8D).

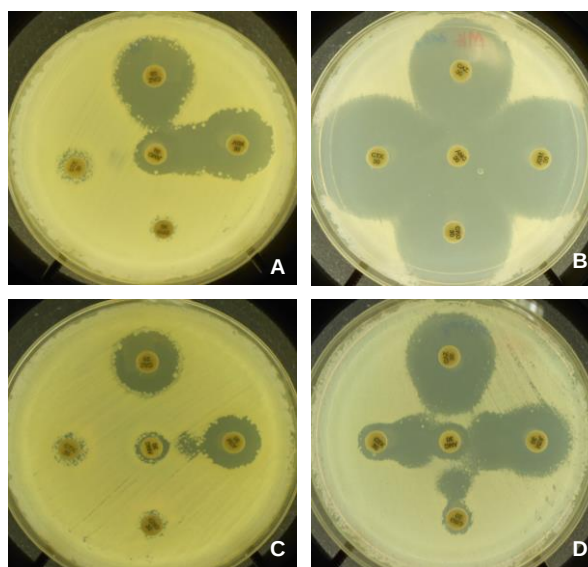


Figura 8. Teste de aproximação de disco de amostra de *E. coli* antes e após ensaio de conjugação. Cepas doadoras: A: BA57c; C: BA57d. Transconjugantes: B: BA57c_t; D: BA57d_t.

Tabela 8. Resultado do ensaio de conjugação para as cepas das Propriedades A e B. Comparação do perfil de resistência fenotípico e genotípico entre as cepas doadoras e transconjugantes.

Cepa	DD - Resistência		DA - ESBL		Genes resistência	
	Doadoras	Transconjugantes	Doadoras	Transconjugantes	Doadoras	Transconjugantes
BA15b	SUT-GEN-TET	SUT- <u>GEN</u> -TET	-	-	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
BA15e	SUT-GEN-TET	SUT- <u>GEN</u> -TET	-	-	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
BA37d	SUT-GEN-TET	SUT- <u>GEN</u> -TET	-	-	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
BA37e	SUT-GEN-TET	SUT- <u>GEN</u> -TET	-	-	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
BA39a	SUT-GEN-TET	SUT- <u>GEN</u> -TET	-	-	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
BA39c	SUT-GEN-TET	SUT-GEN-TET	-	-	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
BA39d	SUT-GEN-TET	SUT- <u>GEN</u> -TET	-	-	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
BA47b	SUT-GEN-TET	SUT-GEN-TET	-	-	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
BA57c	AMP-AMC-CFE-CRO-CFP-CTF-CIP-ENR-SUT-GEN-TET	AMP-AMC-CFE-CRO-CFP-CTF-CIP-ENR-SUT-GEN-TET	CAZ-ATM	N	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>tetA</i>	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>tetA</i>
BA57d	AMP-CFE-CRO-CFP-CTF-CIP-ENR-SUT-GEN-TET	AMP-CFE-CRO-CFP-CTF-SUT-GEN-TET	ATM	CAZ-ATM-CRO-CFX	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>tetA</i>	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>tetA</i>
BB1c	TET	TET	-	-	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
BB1d	TET	TET	-	-	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
BB8a	TET	TET	-	-	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
BB8b	TET	TET	-	-	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
BB8c	TET	TET	-	-	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
BB8d	TET	TET	-	-	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
BB8e	TET	TET	-	-	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
J53	Sensível a todos os antimicrobianos testados		N		N	

DD: disco difusão. DA: Disco aproximação. AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; CFE: cefalexina; CRO: ceftriaxona; CFP: cefoperazona; CTF: ceftiofur; CIP: ciprofloxacina; ENR: enrofloxacin; CLO: cloranfenicol; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina; CAZ: ceftazidima; ATM: aztreonam; CTX: Cefotaxima; GEN: presença de colônias hipermutantes no interior do halo. N: negativo.

Tabela 9. Resultado do ensaio de conjugação para as cepas da Propriedade A coletadas no inverno e verão. Comparação do perfil de resistência fenotípico entre as cepas doadoras e transconjugantes.

Cepa	DD- Resistência		DA - ESBL	
	Doadoras	Transconjugantes	Doadoras	Transconjugantes
MV4e	AMP-AMC-CFE-CIP-ENR-SUT-TET	AMP-AMC-CIP-ENR-SUT-TET	-	-
BV22a	AMP-AMC-CIP-ENR-TET	AMP-AMC-CIP-ENR-TET	-	-
BV22d	AMP-AMC-CIP-ENR-SUT-TET	AMP-AMC-CIP-ENR-SUT-TET	-	-
MI5b	AMP-AMC-CFP-CIP-ENR-CLO-SUT-TET	AMP-CIP-ENR-CLO-SUT-TET	N	N
MI5c	AMP-CFP-CIP-ENR-CLO-SUT-TET	AMP-CIP-ENR-TET	ATM	N
MI5d	AMP-CIP-ENR-CLO-SUT-TET	AMP-CIP-ENR-CLO-SUT-TET	-	-
MI12a	AMP-CIP-ENR-CLO-SUT-TET	AMP-CIP-ENR-CLO-SUT-TET	-	-
MI12c	AMP-AMC-CFP-CIP-ENR-CLO-SUT-TET	AMP-AMC-CIP-ENR-CLO-SUT-TET	CAZ-CTX	N
MI24a	AMP-AMC-CFE-CIP-ENR-CLO-SUT-TET	AMP-AMC-CIP-ENR-CLO-SUT-TET	-	-
MI24c	AMP-AMC-CFP-CIP-ENR-CLO-SUT-TET	AMP-AMC-CIP-ENR-CLO-SUT-TET	N	N
MI24e	AMP-AMC-CFE-CFP-CIP-ENR-CLO-SUT-TET	AMP-AMC-CIP-ENR-SUT-TET	N	N
BI15b	AMP-AMC-CFE-CRO-CFP-CTF-CLO-SUT-TET	AMP-AMC-CFE-CRO-CFP-CTF-SUT-TET	ATM-CAZ-CTX	CAZ-ATM
J53	Sensível a todos os antimicrobianos testados		N	

DD: disco difusão. DA: Disco aproximação. AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; CFE: cefalexina; CRO: ceftriaxona; CFP: cefoperazona; CTF: ceftiofur; CIP: ciprofloxacina; ENR: enrofloxacin; CLO: cloranfenicol; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina; CAZ: ceftazidima; ATM: aztreonam; CTX: Cefotaxima; GEN: presença de colônias hipermutantes no interior do halo. N: negativo.

PARTE 2

4.2. Resistência à polimixina em *E. coli* isoladas da superfície externa de dípteros muscoides e da microbiota intestinal de animais coabitantes em propriedades leiteiras

4.2.1. Resistência fenotípica a polimixina B

Do total de 877 *E. coli* isoladas dos animais conviventes nas propriedades A e B, 361 foram consideradas resistentes, uma vez que apresentaram crescimento em meio de cultura com adição de 2 µg/mL de polimixina B.

Das 361 cepas, 287 foram isoladas da propriedade A, sendo 48 da superfície externa de moscas (35,5%), 127 de bezerros (44%), 98 de vacas (40,8%), dez de cães (40%) e quatro de éguas (40%). Nenhum isolado de mula apresentou resistência. Dos isolados da propriedade B, 74 foram resistentes à polimixina, sendo 18 da superfície externa de moscas (28,6%), 26 de bezerros (52%), 26 de vacas (65%) e quatro de cordeiros (40%). Nenhum isolado de carneiro foi resistente (Figura 9).

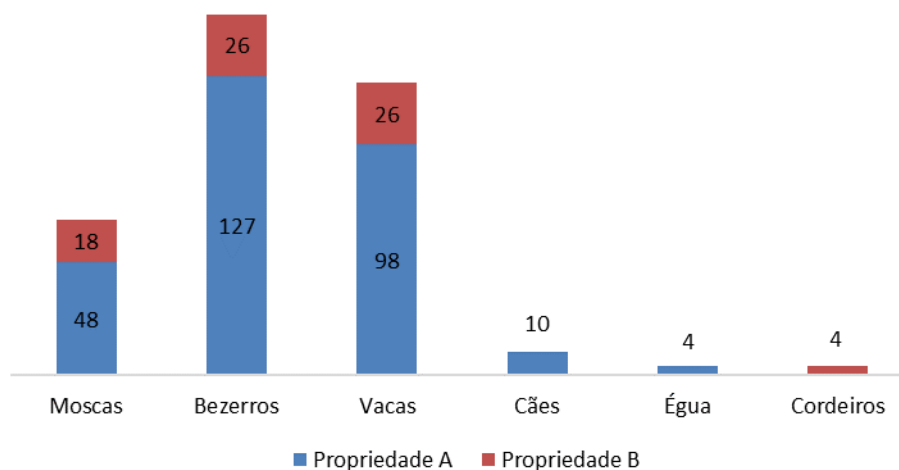


Figura 9. Número de *Escherichia coli* resistente à polimixina por animal e propriedade (Botucatu – SP, 2015).

O teste Exato de Fisher não mostrou associação entre a resistência à polimixina e a multirresistência a antimicrobianos.

Cinco *E. coli* isoladas de bezerros da fazenda B apresentaram o gene *mcr-1* na PCR e o resultado foi confirmado por sequenciamento (GenBank MT832366). O ensaio de conjugação mostrou a transferência de *mcr-1* para as cinco cepas. O perfil de resistência a antimicrobianos, a concentração inibitória mínima de polimixina (CIM), os grupos

filogenéticos e os grupos plasmidiais Inc/replicons estão mostrados na Tabela 10.

As 356 cepas que apresentaram resistência fenotípica à polimixina, não apresentaram genes *mcr*.

Tabela 10. *Escherichia coli* positivas para *mcr-1* isoladas de bezerros da propriedade B (Botucatu – SP, 2015). Concentração inibitória mínima (CIM), grupos filogenéticos e perfil plasmidial.

Cepa	Resistência antimicrobiana ^a	CIM Polimixina (µg/mL)	Filogrupos ^b	PBRT ^c
BB6b	Nenhuma	8	B2	N, FIA, P, K, F
BB6c	AMP-CIP-ENR	4	B2	N, FIA, P, K, F
BB6d	AMP-CIP-ENR-CLO	4	B2	N, FIA, P, K, F
BB6e	AMP	8	B2	N, FIA, FIB, P, K, F
BB9e	CIP-ENR	8	B2	N, FIA, P, K, F

a: AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; ENR: enrofloxacin; CLO: cloranfenicol. b: grupos filogenéticos. c: PCR-based replicon typing.

Os grupos Inc/replicons N, FIA, P, K, F foram detectados em quatro cepas e N, FIA, FIB, P, K, F em uma cepa. Todas as cinco *E. coli* positivas para *mcr-1* foram atribuídas ao grupo filogenético B2. A CIM da polimixina B foi de 4 µg/mL (duas cepas) e 8 µg/mL (três cepas), e uma cepa apresentou multirresistência (BB6d) (Tabela 10). Quanto ao perfil clonal, as cepas de *E. coli* positiva para *mcr-1* mostraram similaridade de 80% (Figura 10).

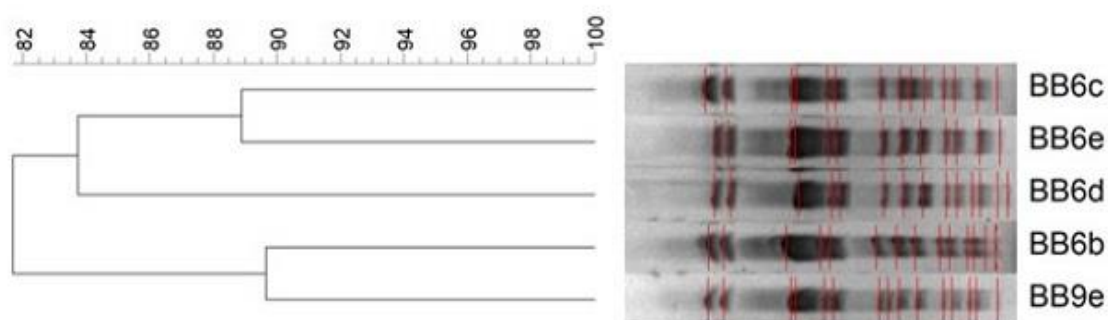


Figura 10. Perfil clonal de *Escherichia coli* positivas para *mcr-1* isoladas de bezerros da propriedade B (Botucatu – SP, 2015). Dendrograma obtido pela técnica de PFGE usando a partir da digestão enzimática do DNA total com XbaI. Os padrões foram gerados pelo método UPGMA, usando coeficiente de Dice, tolerância e otimização de 1% (GelCompar, Applied Maths, Belgium).

A cepa multirresistente BB6d foi selecionada para o sequenciamento do genoma completo a fim da caracterização do ambiente genético do gene *mcr-1*. Comparativamente

outras cepas que foram selecionadas por outras razões, mas que apresentaram resistência fenotípica a polimixina B, também serão abordadas a seguir, nomeadamente as cepas de bezerros BA57d (propriedade A) e BB1d (propriedade B).

A montagem do genoma da cepa *mcr-1* positiva BB6d gerou 121 contigs e um tamanho total de 4.855.760 pb e uma média de 50,68% de conteúdo G+C.

O gene *mcr-1.1* foi localizado em um plasmídeo conjugativo IncX4 de 31.966 pb (Figura 11) com uma cópia de IS26 adjacente ao gene *hns* (possível proteína de ligação ao DNA).

A cepa foi classificada como O101:H9, ST167 no esquema 1 de *Multi-locus Sequence Typing* (MLST) (Wirth et al. 2006) e pertencente ao grupo filogenético A. Foram detectados os Inc/Replicons IncFIB(AP001918), IncFIC(FII) e IncX4.

Além da resistência à polimixina (gene *mcr-1.1*) também foram detectadas resistência a aminoglicosídeos (*aadA1*, *aadA2b*, *aac(6')-Ib7*), sulfonamidas (*sul3*), fenicois (*cmlA1*), quaternário de amônio (*qacL*), macrolídeos (*mefB*) e quinolonas ocasionadas por mutações nos genes cromossomais *parC* (*parC*:p.S80I), *parE* (*parE*:p.S458A) e *gyrA* (*gyrA*:p.S83L e *gyrA*:p.D87N).

As presenças de *sul3* e *qacL* no mesmo *contig* foram de indicativas de integron, e a anotação mais refinada do *contig* mostrou a presença de um integron de classe 1 não usual em conformação circular promovida pela IS26 (Figura 12).

As cepas BA57d e BB1d resistentes à polimixina que não apresentaram gene *mcr*, expressaram a resistência devido a mutações nos genes *arnA*, *pmrC*, *pmrE*, *pmrF*. Mutações em *arnA*, *pmrC*, *pmrF* também foram encontradas na cepa BB6d.

Quanto aos fatores de virulência, a cepa BB6d apresentou *hlyE*, *yeh* (A ao D), *fdeC*, *hra*, *papA_F11*, *papC*, *traT*, *nlpI*, *terC*, *gad*, *csgA*, *traJ*, *iss*, *capU*, *aslA* e *anr*.

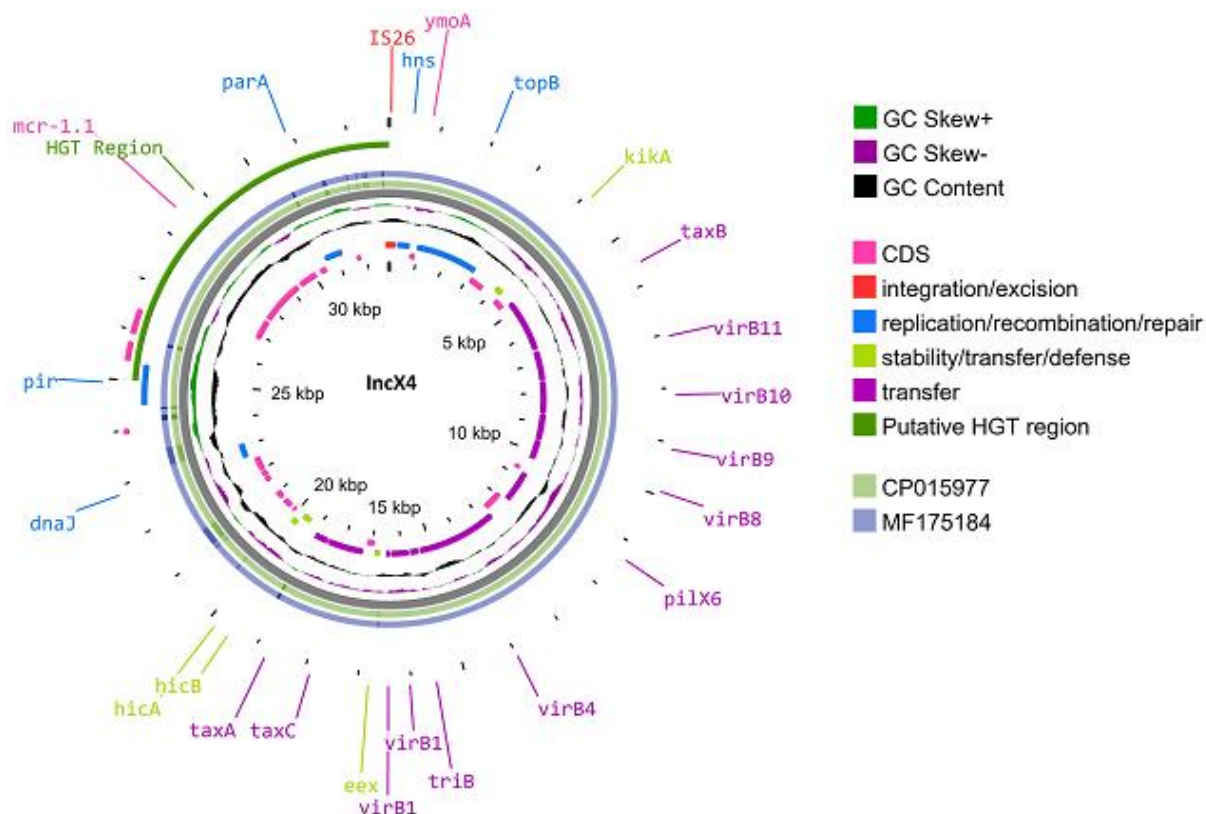


Figura 11. Mapa circular do plasmídeo IncX4 com 31.966 pb albergando *mcr-1.1* gene da cepa BB6d e comparação com dois plasmídeos IncX4 *mcr-1.1* positivo de referência (GenBank CP015977.1 e MF175184.1). As áreas mais escuras nos círculos correspondentes às sequências de referência indicam identidade $\leq 80\%$. Mapa elaborado com Proksee (<https://proksee.ca/>).

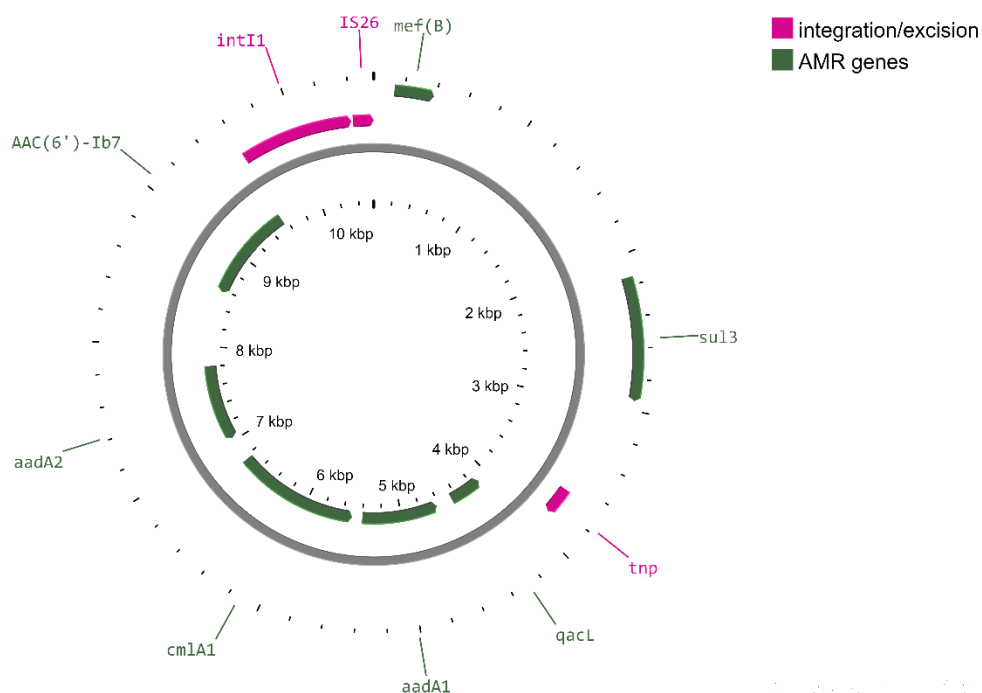


Figura 12. Representação esquemática do integron de classe 1 circularizado pela IS26 encontrado na cepa BB6d portadora do gene *mcr-1.1*. Elaborado com Proksee (<https://proksee.ca/>).

PARTE 3

4.3. Detecção e caracterização das cepas de *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) isoladas da superfície externa de dípteros muscoides e da microbiota intestinal de animais coabitantes em propriedades leiteiras

4.3.1. Detecção de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC)

Dos isolados de 28 bezerros da Propriedade A, 93 das 284 (32,75%) cepas apresentaram *stx1* e/ou *stx2*, 84/93 cepas foram positivas para *stx1*, 12/93 cepas para *stx2*, 66/93 para o gene *eae*. Vinte e sete cepas apresentaram apenas *stx1* e nove apenas *stx2*. Cinquenta e cinco cepas (55/93; 59,14%) apresentaram potencial para *Escherichia coli* Entero-hemorrágica (EHEC) com genótipo positivo para *stx1+eae*. Trinta e oito cepas isoladas dos bezerros e as sete isoladas de 57 moscas⁴ não apresentaram o gene *eae*, incluindo todas as *stx2* positivas (Tabela 11).

Todas as 100 cepas (93 de bezerros e sete de moscas) que apresentaram *stx1* e/ou *stx2* foram testadas quanto à citotoxicidade em células Vero. Após 24 horas, 92/93 cepas isoladas dos bezerros apresentaram efeito citotóxico, assim como todas as sete cepas isoladas das moscas. A Figura 13 ilustra a alteração morfológica (morte celular) em células Vero em duas cepas testadas e os respectivos controles.

Quanto à Propriedade B, 15 cepas foram positivas para *stx1*. Dez isoladas de dois bezerros (10/50; 20%), uma de um carneiro (1/5; 20%) e quatro de dois cordeiros (4/10; 40%), sendo 11 positivas para *stx1+eae* (11/15; 73,33%).

As cepas da Propriedade B que apresentaram o gene *stx1* também foram testadas quanto à citotoxicidade em células Vero. Após 24 horas, todas as dez cepas isoladas dos bezerros, quatro de cordeiro e uma de carneiro apresentaram efeito citotóxico.

⁴ A detecção dos genes *stx* em *E. coli* isoladas da superfície externa de moscas coletadas em 2015 na propriedade A está reportada em (Alves 2017; Alves et al. 2018)

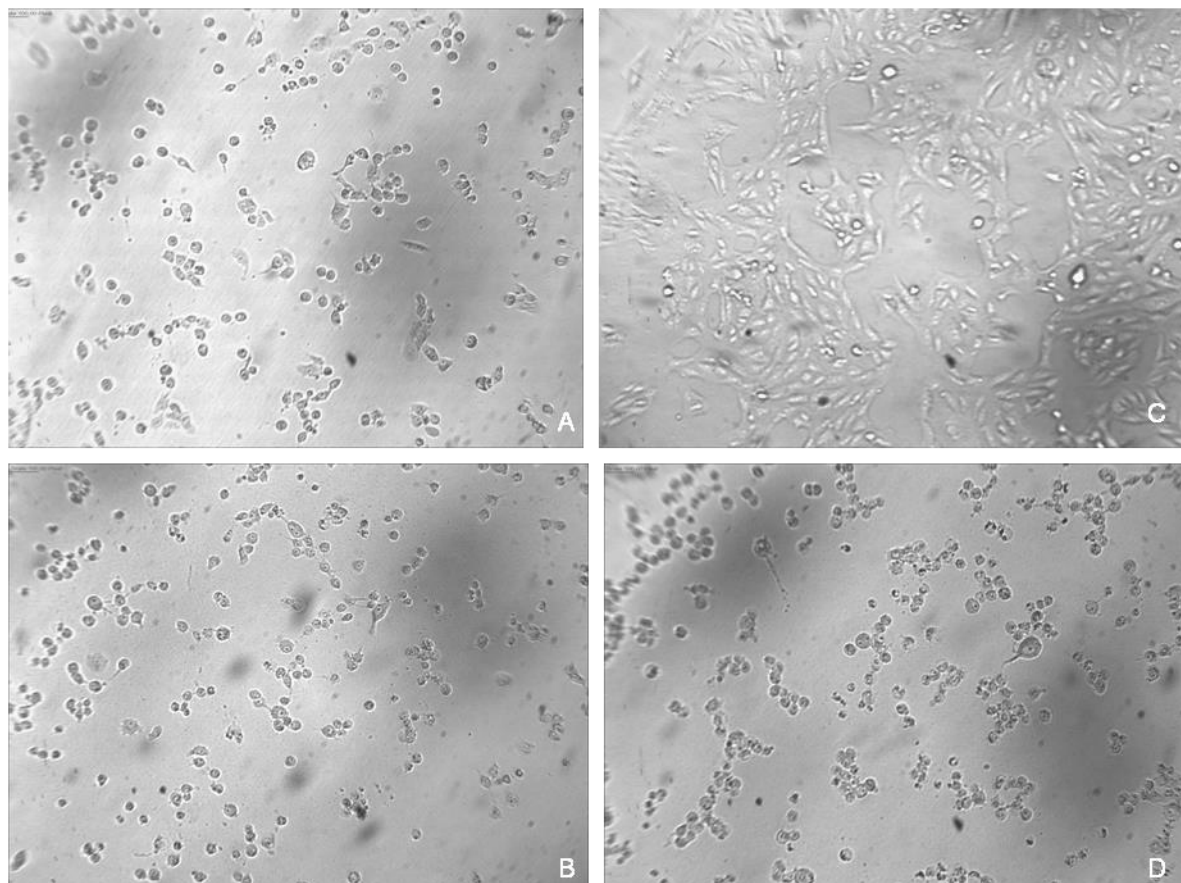


Figura 13. Ensaio de citotoxicidade em células Vero. Leitura após 24 horas de incubação. A: cepa BA5a (bezerro). B: cepa MA11a (mosca). C: controle negativo (meio TSB). D: controle positivo (cepa *E. coli* H30).

4.3.2. Determinação dos sorogrupos “O”

Cinquenta e três cepas positivas para *stx1* e/ou *stx2* das Propriedades A e B, com perfil fenotípico de sensibilidade antimicrobiana distintos, e as sete STEC isoladas de moscas foram selecionadas para o teste. Destas, 35 puderam ser sorotipadas e 18 não reagiram com nenhum dos soros testados. Dos 31 soros utilizados, 10 reagiram com alguma amostra, sendo os mais frequentes O22 (9/35), O4 (7/35) e O5 (7/35). Duas cepas (2/53) apresentaram sorogrupo O26 e duas o sorogrupo O103. As cepas isoladas das moscas não reagiram a nenhum dos soros selecionados. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 11. A Figura 14 ilustra a leitura do teste.

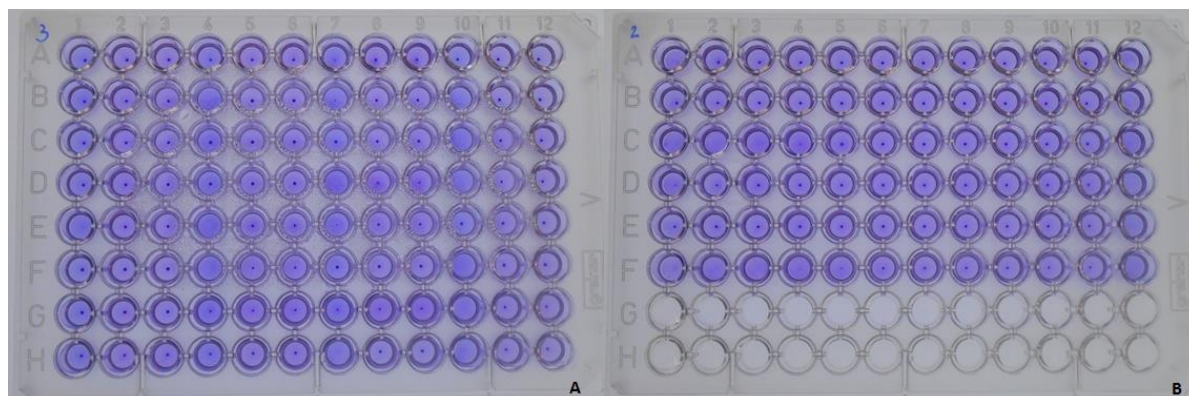


Figura 14. Teste de aglutinação do antígeno “O”. A: Teste com *pool* 4. Colunas 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11 e 12: controles negativos. E1, B4, E4, F4, D7, E7, B10, C10, D10, F10, G10 e H10: positivos. B: Diluições seriadas para determinação de soro em caso de múltiplos soros positivos. Coluna 12: controle positivo

4.3.3. Determinação dos sorogrupos “H”

As cepas que tiveram o antígeno “O” determinados foram utilizadas para a tipagem do antígeno “H”. Das 40 amostras testadas, 38 (95%) apresentaram motilidade positiva. Destas, 14 (36,8%) reagiram com algum dos soros testados. Dos 21 soros utilizados oito reagiram com alguma amostra.

Uma amostra da propriedade A foi sorotipada como O26:H11(BA19e). Foram encontradas 30 combinações distintas entre os diferentes sorotipos identificados e os genes *stx1*, *stx2* e *eae*, demonstrando diversidade entre os sorotipos das STEC da Propriedade A (As cepas da Propriedade B isoladas dos bezerros e cordeiros apresentaram o mesmo sorogrupo O4 e a do carneiro O91 (Tabela 12).

4.3.4. Fatores de virulência e perfil de sensibilidade antimicrobiana

Do total das 60 cepas de STEC sorotipadas, seis (10%) apresentaram multirresistência (resistência três classes de antimicrobianos ou mais), das quais, duas cepas de bezerros (BA36c, BA57c) foram resistentes a cinco classes (Tabela 11).

Das 34 STECs *eae* negativas (LEE-negativas), seis apresentaram o gene *hes* (17,65%) e duas apresentaram *eae* e *hes* simultaneamente. Sete cepas negativas para *eae* e *hes* apresentam *saa*, três apresentaram *eae+saa* e uma *hes+saa*. O gene *ehxA* foi encontrado em sete cepas (7/60; 11,67%).

Tabela 11. Cepas de *Escherichia coli* (STEC) selecionadas para sorotipagem isoladas de bezerros, cordeiros, carneiro e superfície externa de moscas das Propriedades A e B (Botucatu – SP, 2015). Sensibilidade antimicrobiana e fatores de virulência. (Continua)

Isolado	Filogruppo	Sorogrupo/ sorotipo	Resistência												Fatores de virulência						Biofilme	
			AMP	AMC	CFE	CRO	CFP	CTF	CIP	ENR	CLO	SUT	GEN	TET	eae	stx1	stx2	saa	ehxA	hes		
BA2a	B1	O126:H?														+	+	-	-	-	-	Fraco
BA3b	B1	O126:H?														-	+	-	-	-	-	Fraco
BA5a	F	O22:H?														-	-	+	-	-	+	Fraco
BA5b	B1	O22:H?														-	-	+	-	-	+	Fraco
BA5d	E	O123:H14														-	-	+	-	-	+	Fraco
BA6a	B1	O22:H?														+	+	-	-	-	-	Moderado
BA6b	B1	O22:H?														+	+	-	-	-	+	Fraco
BA9a	B1	O22:H?														-	+	+	-	-	+	Fraco
BA9b	B1	O22:H19														-	+	+	-	-	+	Fraco
BA12b	B1	O123:H39														-	+	-	-	-	-	Negativo
BA16a	B1	OND														+	+	-	-	-	-	Negativo
BA16b	B1	O22:H?														+	+	-	-	-	+	Negativo
BA18a	B1	O7:H2														-	+	-	-	-	-	Negativo
BA18d	B1	O7:H?														-	+	-	+	-	+	Negativo
BA18e	B1	OND														-	+	-	+	-	-	Negativo
BA19a	B1	OND														-	+	-	+	-	-	Negativo
BA19c	B1	O26:H?														+	+	-	+	+	-	Negativo
BA19e	B1	O26:H11														+	+	-	+	+	-	Negativo
BA20a	B1	OND														-	+	-	+	-	-	Negativo
BA24b	B1	O7:H14														+	+	-	-	-	-	Fraco
BA26b	B1	O26:H?														+	+	-	-	-	-	Fraco

BA: Bezerro da propriedade A; BB: Bezerro da propriedade B; CO: Cordeiro; CN: Carneiro; OND: Antígeno O não determinado; H?: Antígeno H não identificado; H-: Motilidade negativa; AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina + Ácido Clavulânico; CFE: Cefalexina; CRO: Ceftriaxona; CFP: Cefoperazona; CTF: Ceftiofur; CIP: Ciprofloxacina; ENR: Enrofloxacin; CLO: Clorafenicol; SUT: Sulfametoxazol + Trimetoprim; GEN: Gentamicina; TET: Tetraciclina; Células cinza: cepa com perfil de resistência intermediário ao antimicrobiano; Células pretas: cepa resistente ao antimicrobiano.

Tabela 11. Cepas de *Escherichia coli* (STEC) selecionadas para sorotipagem isoladas de bezerros, cordeiros, carneiro e superfície externa de moscas das Propriedades A e B (Botucatu – SP, 2015). Sensibilidade antimicrobiana e fatores de virulência. (Continuação)

Isolado	Filogruppo	Sorogrupo/ sorotipo	Resistência												Fatores de virulência						Biofilme	
			AMP	AMC	CFE	CRO	CFP	CTF	CIP	ENR	CLO	SUT	GEN	TET	eae	stx1	stx2	saa	ehxA	hes		
BA27d	E	OND														-	+	-	+	-	-	Fraco
BA30e	cladoI/II	O103:H?														-	-	+	-	+	-	Fraco
BA32a		B1	O7:H?													+	+	-	-	-	-	Negativo
BA33c	B1	O118:H?														+	+	-	-	-	-	Fraco
BA36a	B1	O103:H12														+	+	-	-	-	-	Fraco
BA36b	B1	O7:H8														+	+	-	-	-	-	Moderado
BA36c	B1	O7:H16														+	+	-	-	-	-	Negativo
BA37d	B1	OND														-	-	+	-	-	-	Fraco
BA41d	B1	O23:H?														-	+	-	-	-	-	Fraco
BA42b	B1	O23:H?														+	+	-	-	-	-	Fraco
BA42c	B1	OND														+	+	-	-	-	-	Fraco
BA43d	B1	O7:H?														+	+	-	-	-	-	Fraco
BA44a	B1	O7:H2														+	+	-	-	-	-	Fraco
BA47b	B1	OND														-	-	+	-	-	-	Fraco
BA53a	B1	OND														-	+	-	-	-	-	Fraco
BA54a	B1	OND														+	+	-	-	-	-	Fraco
BA56b	B1	OND														+	+	-	-	-	-	Fraco
BA56e	B1	O7:H-														+	+	-	-	-	-	Fraco
BA57b	B1	O7:H2														-	+	-	-	-	-	Fraco
BA57c	B1	OND														-	+	-	-	-	-	Fraco
BA58b	B1	OND														-	+	-	-	-	-	Fraco
BA58c	B1	O7:H11														-	+	-	-	-	-	Negativo

BA: Bezerro da propriedade A; BB: Bezerro da propriedade B; CO: Cordeiro; CN: Carneiro; OND: Antígeno O não determinado; H?: Antígeno H não identificado; H- : Motilidade negativa; AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina + Ácido Clavulânico; CFE: Cefalexina; CRO: Ceftriaxona; CFP: Cefoperazona; CTF: Ceftiofur; CIP: Ciprofloxacina; ENR: Enrofloxacin; CLO: Clorafenicol; SUT: Sulfametoxazol + Trimetoprim; GEN: Gentamicina; TET: Tetraciclina; Células cinza: cepa com perfil de resistência intermediário ao antimicrobiano; Células pretas: cepa resistente ao antimicrobiano.

Tabela 11. Cepas de *Escherichia coli* (STEC) selecionadas para sorotipagem isoladas de bezerros, cordeiros, carneiro e superfície externa de moscas das Propriedades A e B (Botucatu – SP, 2015). Sensibilidade antimicrobiana e fatores de virulência. (Conclusão)

Isolado	Filogruppo	Sorogrupo/ sorotipo	Resistência											Fatores de virulência						Biofilme				
			AMP	AMC	CFE	CRO	CFP	CTF	CIP	ENR	CLO	SUT	GEN	TET	eae	stx1	stx2	saa	ehxA		hes			
BB1a	B1	O4:H?															-	+	-	-	+	-	Fraco	
BB1b	B1	O4:H?																-	+	-	-	-	-	Negativo
BB1c	B1	O4:H?																-	+	-	-	-	-	Fraco
BB1d	B1	O4:H?																+	+	-	-	-	-	Fraco
BB1e	B1	O4:H?																+	+	-	-	+	-	Moderado
BB8a	B1	OND																-	+	-	-	+	-	Forte
CO1a	B1	O4:H?																+	+	-	-	+	-	Fraco
CO1e	B1	O4:H?																+	+	-	-	-	-	Fraco
CO2e	B1	OND																-	+	-	-	-	-	Fraco
CN1c	B1	O91:H-																+	+	-	+	-	-	Fraco
MA11a	B1	OND																-	+	-	+	-	-	Moderado
MA11b	B1	OND																-	+	-	+	-	-	Fraco
MA11c	E	OND																-	+	-	-	-	-	Fraco
MA11d	B1	OND																-	+	-	+	-	-	Fraco
MA11e	B1	OND																-	+	-	+	-	-	Forte
MA18a	E	OND																-	+	-	-	-	-	Fraco
MA18d	E	OND																-	+	-	-	-	-	Fraco

BA: Bezerro da propriedade A; BB: Bezerro da propriedade B; CO: Cordeiro; CN: Carneiro; OND: Antígeno O não determinado; H?: Antígeno H não identificado; H-: Motilidade negativa; AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina + Ácido Clavulânico; CFE: Cefalexina; CRO: Ceftriaxona; CFP: Cefoperazona; CTF: Ceftiofur; CIP: Ciprofloxacina; ENR: Enrofloxacin; CLO: Clorafenicol; SUT: Sulfametoxazol + Trimetoprim; GEN: Gentamicina; TET: Tetraciclina; Células cinza: cepa com perfil de resistência intermediário ao antimicrobiano; Células pretas: cepa resistente ao antimicrobiano.

Tabela 12. Sorotipos e genes *stx* e *eae* associados em *Escherichia coli* isoladas de bezerros, cordeiros e carneiro das Propriedades A e B (Botucatu – SP, 2015).

Sorotipos	Fatores de virulência	Animal	Propriedade
O4:H?	<i>stx1</i> <i>stx1</i> <i>stx1</i> e <i>eae</i> <i>stx</i> e <i>eae</i>	Bezerros e cordeiros	B
O7:H2	<i>stx1</i> <i>stx1</i> <i>stx1</i> e <i>eae</i>		
O7:H8	<i>stx1</i> e <i>eae</i> <i>stx1</i> e <i>eae</i> <i>stx1</i> e <i>eae</i>		
O7:H11	<i>stx1</i>		
O7:H14	<i>stx1</i> e <i>eae</i>	Bezerros	A
O7:H16	<i>stx1</i> e <i>eae</i>		
O7:H?	<i>stx1</i> e <i>eae</i>		
O7:H-	<i>stx1</i> e <i>eae</i>		
O22:19	<i>stx1</i> e <i>eae</i>		
O22:H?	<i>stx2</i> <i>stx1</i> e <i>eae</i> <i>stx1</i> e <i>eae</i>		
O23:H?	<i>stx1</i> <i>stx1</i> e <i>eae</i> <i>stx1</i> e <i>eae</i>		
O26:11	<i>stx1</i> e <i>eae</i>		
O26:H?	<i>stx1</i> e <i>eae</i>		
O91:H-	<i>stx1</i>	Carneiro	B
O103:H12	<i>stx1</i> e <i>eae</i>	Bezerros	A
O103:H?	<i>stx2</i>		
O118:H?	<i>stx1</i> e <i>eae</i>		
O123:H14	<i>stx2</i>		
O123:H39	<i>stx1</i>		
O126:H?	<i>stx1</i> <i>stx1</i> e <i>eae</i>		

4.3.5. Classificação filogenética e formação de biofilme

Das 60 STEC selecionadas, 53 (88,3%) foram alocadas no grupo B1, cinco (8,3%) no grupo E, uma (1,6%) o grupo F e uma (1,6%) no grupo *Escherichia* clado I ou I (Tabela 11).

As cepas isoladas de bezerros apresentaram biofilme fraco (32/49), moderado (3/49) e forte (1/49). Quatorze cepas não apresentaram formação de biofilme. As quatro cepas dos ovinos apresentaram biofilme fraco. Uma cepa de mosca apresentou biofilme forte (1/7), uma cepa com biofilme moderado e cinco fraco (5/7) (Tabela 11).

4.3.6. Detecção de STEC em isolados obtidos nos períodos de inverno e verão

Das cepas isoladas das coletas de inverno, seis apresentaram *stx1*, sendo cinco de bezerros (5/102; 4,9%) e uma do açude (1/2; 50%) também positiva para *eae* (*stx1+eae*, 1/6; 16,67%). Nenhum isolado de mosca apresentou gene *stx*. Da coleta de verão, dez cepas de bezerros apresentaram *stx2* (10/142; 7,04%), 14 de moscas apresentaram *stx1*(3) ou *stx2* (11) (14/69; 20,29%) e três amostras de bebedouro apresentaram *stx2* (3/15; 20%). Os genes *stx1+eae* foram encontrados em duas *E. coli* de moscas (2/14; 14,29%). Quanto aos testes em células Vero, as seis cepas de inverno e apenas duas de moscas apresentaram efeito citotóxico (Tabela 13).

As cinco cepas de bezerros isoladas no inverno foram alocadas no grupo filogenético B2 apresentaram *stx1+saa* e quatro apresentaram multirresistência (beta-lactâmicos, sulfonamidas e tetraciclina). A cepa isolada do açude não teve o grupo filogenético determinado pela técnica utilizada, apresentou *stx1+eae+ehxA* e multirresistência (beta-lactâmicos, fenicois, tetraciclina).

Dos isolados de bezerros obtidos no verão, uma cepa de bezerro apresentou *stx2+saa*, duas foram atribuídas ao grupo filogenético B1, três foram multirresistentes (beta-lactâmicos, fenicois, tetraciclina) e uma a beta-lactâmicos, quinolonas, fenicois e tetraciclina (Tabela 13). Uma cepa do bebedouro apresentou multirresistência (beta-lactâmicos, quinolonas, fenicois e tetraciclina) e uma foi alocada no filogruppo B2. Quanto aos isolados de moscas, dois apresentaram *stx1+eae+ehxA* e um *stx2+saa*. Sete cepas apresentaram multirresistência (7/14; 50%) (Tabela 13).

4.3.7. Perfil clonal de STEC isoladas de moscas e animais coabitantes em propriedades leiteiras

Para análise da similaridade genômica pela técnica de PFGE foram selecionadas as STECs multirresistentes a antimicrobianos obtidas das amostras da propriedade A e B em 2015 e as coletadas em 2019 nos períodos de inverno e verão. O perfil de macrorrestrição obtido com a enzima XbaI está ilustrado no dendrograma da Figura 15.

Não foram encontradas cepas com o mesmo pulsotipo (clones) entre as STEC selecionadas, uma vez que nenhum agrupamento (*cluster*) apresentou similaridade maior do que 90% (Tenover et al. 1995). Duas cepas de bezerros (BV10e e BV11e) apresentaram similaridade genômica de aproximadamente 85%, mas perfil de resistência fenotípica distinto (Figura 15).

De um modo geral, as STEC apresentaram diversidade genética e não houve agrupamento decorrente da origem do isolado e/ou do momento em que foram coletadas. No entanto, cepas oriundas de bezerros no verão e da primeira coleta, da propriedade A e da propriedade B apresentaram similaridade de 60% em seus respectivos *clusters*, além de duas cepas isoladas de moscas e as isoladas de água que apresentaram 65% de similaridade genômica em cada *cluster*.

Tabela 13. Cepas de *Escherichia coli* (STEC) isoladas de bezerros, água e superfície externa de moscas na Propriedade A nos períodos de inverno e verão (Botucatu – SP, 2019). Sensibilidade antimicrobiana, fatores de virulência e grupos filogenéticos. (Continua)

				Resistência												Fatores de virulência					
	Isolado	Filogruppo	Teste Vero	AMP	AMC	CFE	CRO	CFP	CTF	CIP	ENR	CLO	SUT	GEN	TET	eae	stx1	stx2	saa	ehxA	hes
Inverno																					
Bezerros	BI15a	B2	Positivo													-	+	-	+	-	-
	BI15b	B2	Positivo													-	+	-	+	-	-
	BI15c	B2	Positivo													-	+	-	+	-	-
	BI15d	B2	Positivo													-	+	-	+	-	-
	BI15e	B2	Positivo													-	+	-	+	-	-
Açude	ACU5i	ND	Positivo													+	+	-	-	+	-
Verão																					
Bezerros	BV10b	ND	Negativo													-	-	+	-	-	-
	BV10c	ND	Negativo													-	-	+	-	-	-
	BV10d	ND	Negativo													-	-	+	-	-	-
	BV10e	ND	Negativo													-	-	+	-	-	-
	BV11a	ND	Negativo													-	-	+	-	-	-
	BV11c	ND	Negativo													-	-	+	-	-	-
	BV11d	ND	Negativo													-	-	+	-	-	-
	BV11e	ND	Negativo													-	-	+	-	-	-
	BV28a	B1	Negativo													-	-	+	-	-	-
	BV28e	B1	Negativo													-	-	+	+	-	-
Bebedouro	3BEV1	ND	Negativo													-	-	+	-	-	-
	3BEV3	ND	Negativo													-	-	+	-	-	-
	3BEV4	B2	Negativo													-	-	+	-	-	-

BI: bezerro inverno; ACU: açude; BV: bezerro verão; BEV: bebedouro verão; AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina + Ácido Clavulânico; CFE: Cefalexina; CRO: Ceftriaxona; CFP: Cefoperazona; CTF: Ceftiofur; CIP: Ciprofloxacina; ENR: Enrofloxacin; CLO: Clorafenicol; SUT: Sulfametoxazol + Trimetoprim; GEN: Gentamicina; TET: Tetraciclina; Células cinza: cepa com perfil de resistência intermediário ao antimicrobiano; Células pretas: cepa resistente ao antimicrobiano. ND: não determinado pela técnica.

Tabela 13. Cepas de *Escherichia coli* (STEC) isoladas de bezerros, água e superfície externa de moscas na Propriedade A nos períodos de inverno e verão (Botucatu – SP, 2019). Sensibilidade antimicrobiana, fatores de virulência e grupos filogenéticos (Conclusão)

	Isolado	Filogrupo	Teste Vero	Resistência											Fatores de virulência						
				AMP	AMC	CFE	CRO	CFP	CTF	CIP	ENR	CLO	SUT	GEN	TET	eae	stx1	stx2	saa	ehxA	hes
Moscas	MV2a	ND	Negativo	■									■		■	-	-	+	-	-	-
	MV2c	ND	Negativo													-	-	+	-	-	-
	MV2d	ND	Negativo								■		■		■	-	-	+	-	-	-
	MV2e	ND	Negativo													-	-	+	+	-	-
	MV10b	ND	Negativo	■	■			■								-	+	-	-	-	-
	MV10c	ND	Positivo	■	■							■				+	+	-	-	+	-
	MV10d	ND	Negativo	■	■			■								-	-	+	-	-	-
	MV10e	ND	Positivo	■	■			■				■				+	+	-	-	+	-
	MV12b	ND	Negativo	■	■											-	-	+	-	-	-
	MV12c	ND	Negativo	■	■							■				-	-	+	-	-	-
	MV12e	ND	Negativo	■	■							■				-	-	+	-	-	-
	MV16e	B1	Negativo													-	-	+	-	-	-
	MV23c	B1	Negativo													-	-	+	-	-	-
	MV24e	B1	Negativo	■	■							■				-	-	+	-	-	-

MV: mosca verão; AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina + Ácido Clavulânico; CFE: Cefalexina; CRO: Ceftriaxona; CFP: Cefoperazona; CTF: Ceftiofur; CIP: Ciprofloxacina; ENR: Enrofloxacin; CLO: Clorafenicol; SUT: Sulfametoxazol + Trimetoprim; GEN: Gentamicina; TET: Tetraciclina; Células cinza: cepa com perfil de resistência intermediário ao antimicrobiano; Células pretas: cepa resistente ao antimicrobiano. ND: não determinado pela técnica.

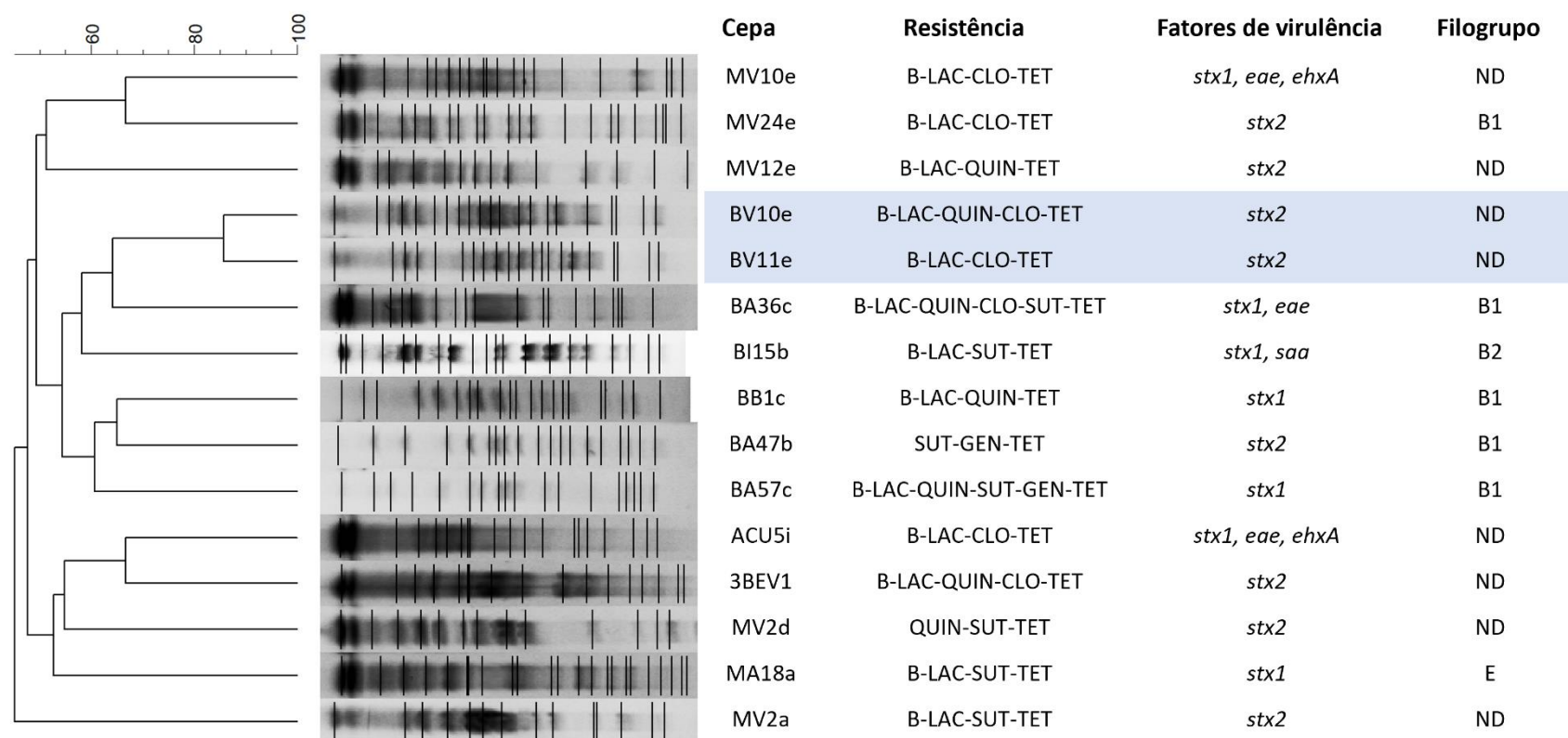


Figura 15. Perfil clonal de STECs multirresistentes a antimicrobianos isoladas de fezes de bezerros, superfície externa de moscas e de amostras de água (Botucatu – SP, 2015; 2019). Dendrograma obtido pela técnica de PFGE a partir da digestão enzimática do DNA total com XbaI. Os padrões foram gerados pelo método UPGMA, usando coeficiente de Dice, tolerância e otimização de 1% (GelCompar, Applied Maths, Belgium). Em azul os pulsotipos com 85% de similaridade genômica. Cepas de 2015: BA: bezerro propriedade A; BB: bezerro propriedade B; MA: mosca propriedade A. Cepas de 2019: MV: mosca verão; BV: bezerro verão; 3BEV: água bebedouro 3 verão; BI: bezerro inverno; ACU5i: açude inverno isolado 5. B-LAC: beta-lactâmicos; CLO: cloranfenicol; TET: tetraciclina; QUIN: quinolonas; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim.

PARTE 4

4.4. Perfil de *E. coli* isoladas de dípteros muscoides e animais coabitantes em propriedades leiteiras e a permanência da resistência a antimicrobianos no ambiente

4.4.1. Resistência fenotípica e genotípica a antimicrobianos

As comparações entre a resistência antimicrobiana encontrada entre os grupos de estudo (moscas⁵, bezerros, vacas, mulas, éguas, cães, cordeiros e carneiro) foram realizadas com o teste Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn com significância $p < 0,05$.

A resistência fenotípica das cepas de *E. coli* isoladas dos animais da Propriedade A estão apresentados na Figura 16. Houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre a resistência fenotípica obtida entre os isolados de moscas comparados aos de vacas, mulas e éguas da Propriedade A (Figura 17). Também houve diferença entre as frequências de resistência obtidas entre as cepas de bezerros e mulas e entre mulas e cães.

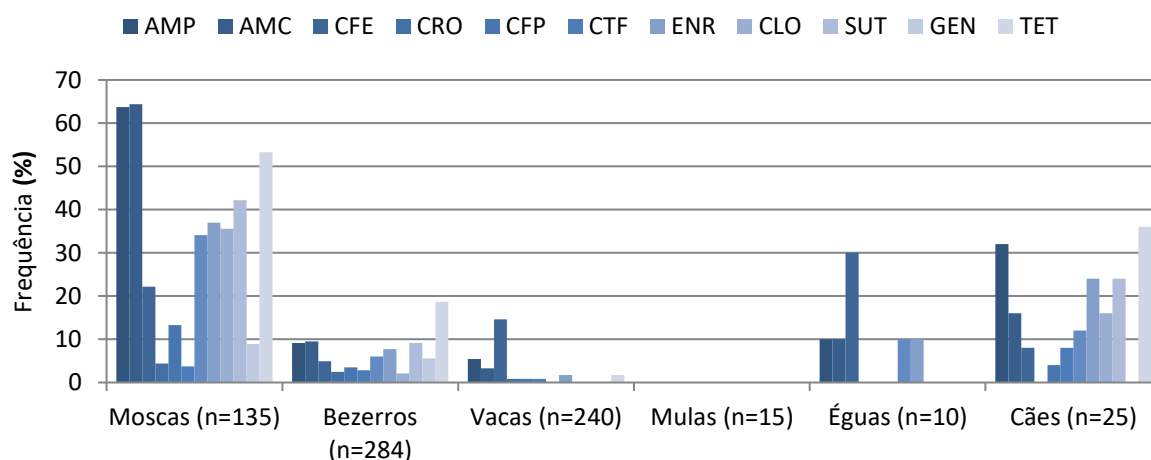


Figura 16. Frequência fenotípica relativa da resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli* isoladas da superfície externa de dípteros muscoides e fezes de bezerros, vacas, mulas, éguas e cães da Propriedade A (Botucatu- SP, 2015). n: número de cepas total; AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; CFE: cefalexina; CRO: ceftriaxona; CFP: cefoperazona; CTF: ceftiofur; CIP: ciprofloxacina; ENR: enrofloxacina; CLO: cloranfenicol; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina.

⁵ A frequência relativa da resistência a antimicrobianos em *E. coli* isoladas da superfície externa de moscas nas Propriedades A e B em 2015 fazem parte dos resultados publicados anteriormente (Alves 2017; Alves et al. 2018).

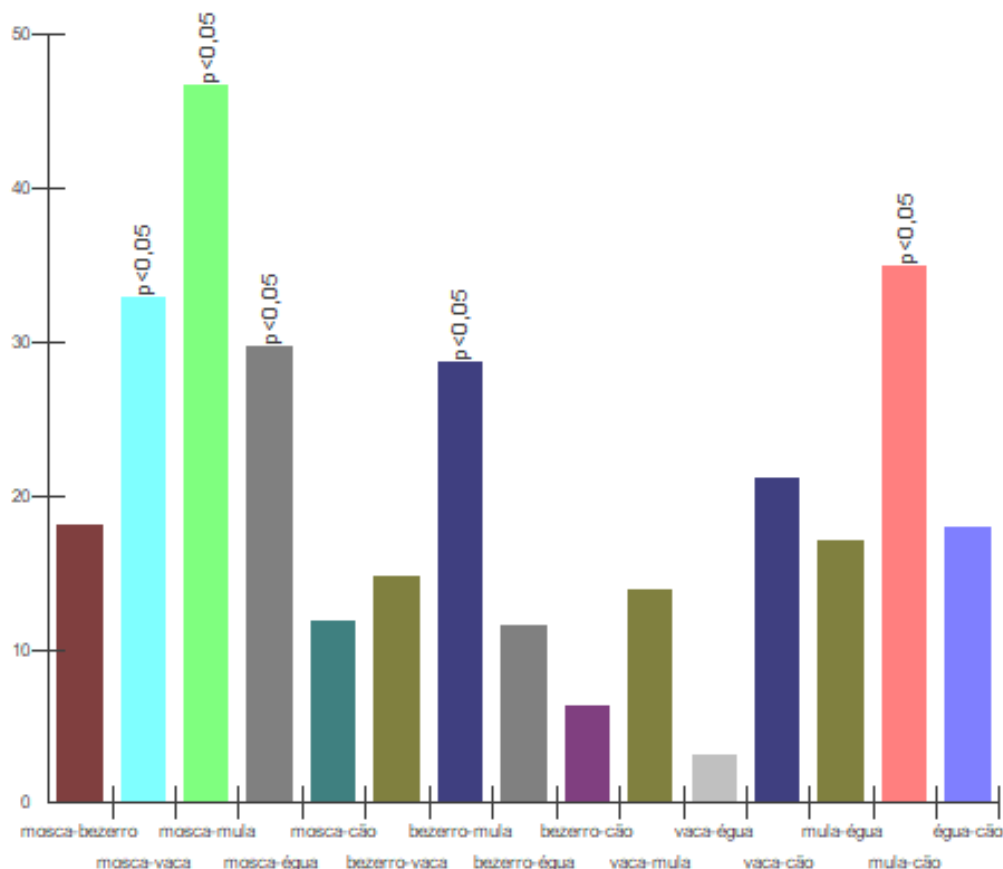


Figura 17. Frequência da resistência fenotípica a antimicrobianos entre os animais coabitantes na Propriedade A (moscas, bezerros, vacas, mulas, éguas e cães). Diferença entre as médias dos postos. Teste Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn com significância $p < 0,05$. Botucatu-SP, 2015. BioEstat 5.0.

A resistência fenotípica das cepas de *E. coli* isoladas dos animais da Propriedade B está ilustrada na Figura 18. Houve diferença significativa entre os grupos de cepas isoladas de bezerros e de carneiro e cordeiros. Também houve diferença entre as frequências de resistência a antimicrobianos obtida dos isolados de vacas e entre as dos cordeiros e carneiro (Figura 19).

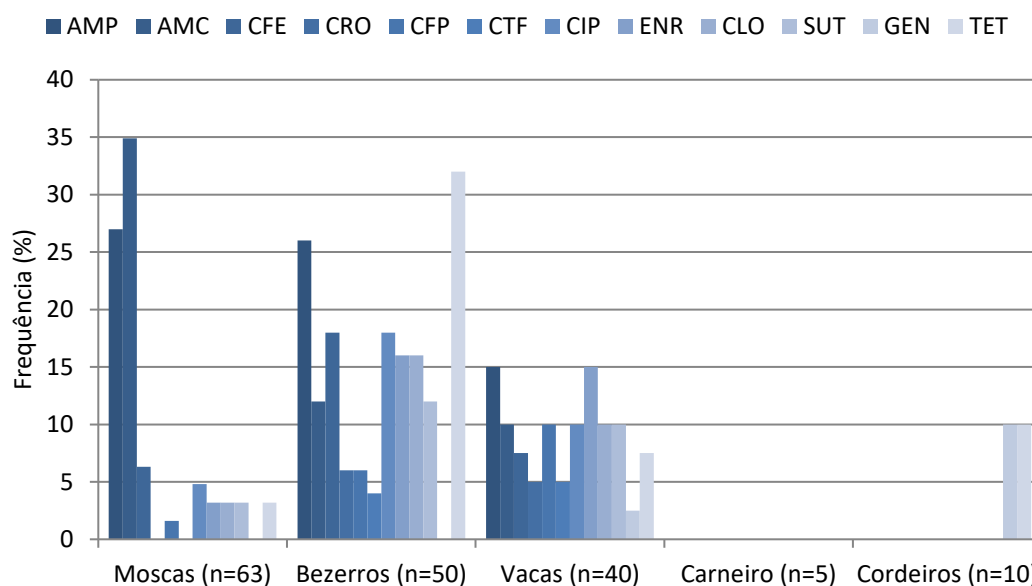


Figura 18. Frequência fenotípica relativa da resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli* isoladas da superfície externa de dípteros muscoides e fezes de bezerros, carneiro e cordeiros da Propriedade B (Botucatu- SP, 2015). n: número de cepas total; AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; CFE: cefalexina; CRO: ceftriaxona; CFP: cefoperazona; CTF: ceftiofur; CIP: ciprofloxacina; ENR: enrofloxacina; CLO: cloranfenicol; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina

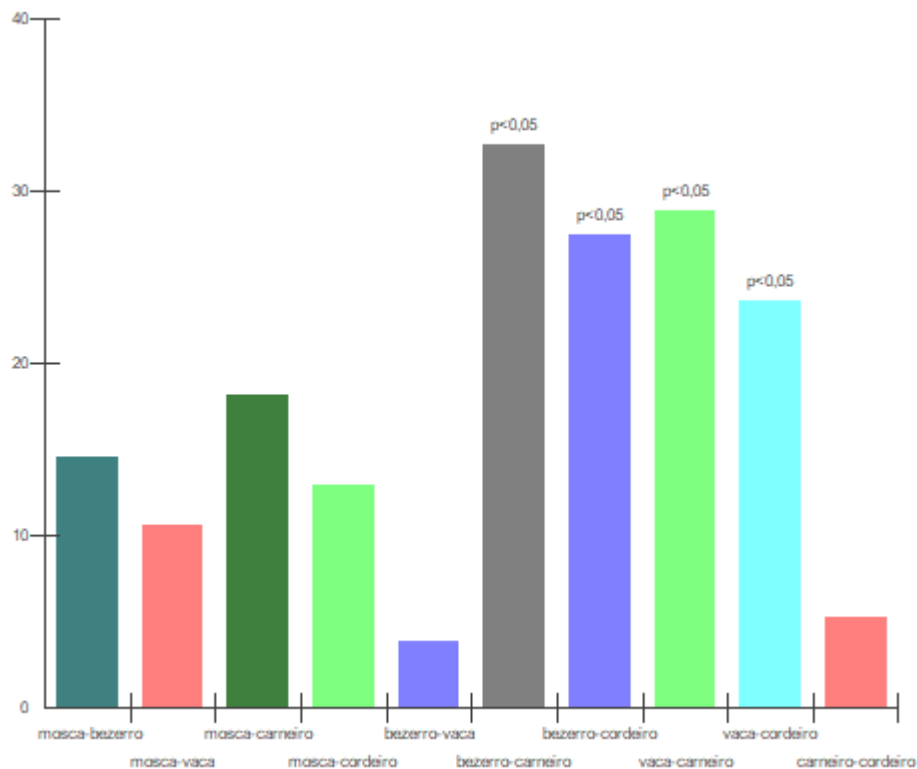


Figura 19. Frequência da resistência fenotípica a antimicrobianos entre os animais coabitantes na Propriedade B (moscas, bezerros, vacas, cordeiros e carneiro). Diferença entre as médias dos postos. Teste Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn com significância $p<0,05$. Botucatu-SP, 2015. BioEstat 5.0.

Entre os isolados da Propriedade A obtidos em 2015 e em 2019 nos períodos de inverno e verão, positivos para integron, é possível notar o agrupamento em dois grandes grupos quanto ao perfil de resistência (Figura 20). Em ambos os perfis de cepas isoladas de moscas e bezerros apresentam semelhanças (MV4 e BV22, moscas e bezerros do verão; BA57c e MA17, moscas e bezerros de 2015).

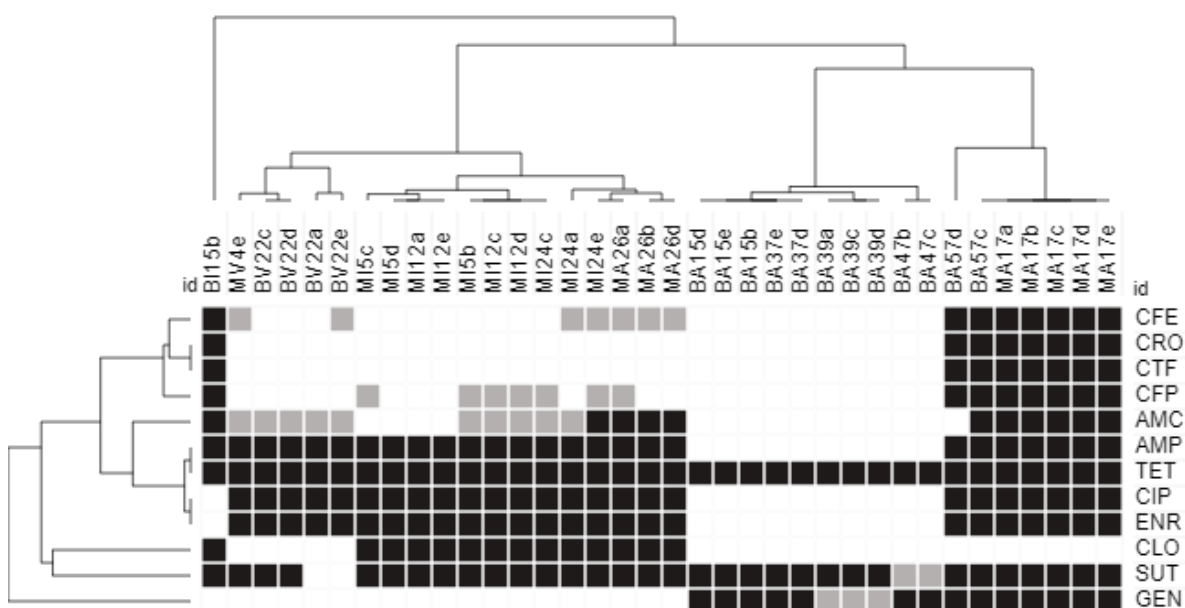


Figura 20. Agrupamento hierárquico e *heatmap* da resistência fenotípica aos antimicrobianos testados em *Escherichia coli* isoladas da superfície externa de moscas e fezes de bezerros (Botucatu-SP, 2015; 2019). As colunas representam as cepas e as linhas o antimicrobiano. Células em preto indicam o perfil resistente, cinza o perfil intermediário e em branco o sensível. Agrupamento e figura gerados com <https://software.broadinstitute.org/Morpheus>, matriz de distância binária e correlação de Pearson.

MA: mosca 2015; BA: bezerro 2015; BI: bezerro inverno; MI: mosca inverno; BV: bezerro verão; MV: mosca verão; AMP: ampicilina, AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; CFE: cefalexina; CRO: ceftriaxona; CFP: cefoperazona; CTF: ceftiofur; CIP: ciprofloxacina; ENR: enrofloxacina; CLO: cloranfenicol; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina.

4.4.2. Perfil clonal (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)

As cepas positivas para integron de classe 1 isoladas dos bezerros nas Propriedades A (12 cepas) e B (10 cepas) foram selecionadas para o ensaio de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE). A Figura 21 ilustra o perfil de macrorrestrição obtido com a enzima XbaI. Uma cepa da Propriedade A não foi incluída na análise de UPGMA, pois não foi tipável pela técnica.

Para análise de similaridade genômica foram incluídas todas as cepas positivas para integron (moscas e bezerros das duas propriedades).

A partir dos perfis de macrorrestrição do DNA genômico foram considerados 15 pulsotipos segundo os critérios estabelecidos por (Tenover et al. 1995) e representados no dendrograma pelos números de 1 a 15 (Figura 21). As cepas com similaridade genômica maior que 90% foram consideradas clones.

Todas as cepas de bezerros testadas da Propriedade B foram agrupadas em um mesmo *cluster* com 72% de similaridade genômica. Já as cepas de bezerros da Propriedade A foram organizadas em três *clusters* distintos com similaridade menor que 60%, representados pelos pulsotipos 1, 3, 4, 11 e 15.

Os pulsotipos 3, 5, 6, 7, 12 e 14 são compostos por cepas clones, sendo que o pulsotipo 3 é composto por cepas isoladas dos bezerros da Propriedade A e os pulsotipos 12 e 14 por cepas isoladas da superfície externa de dípteros muscoides. Os pulsotipos 5, 6, 7, 8 e 9 são constituídos por cepas isoladas dos bezerros da Propriedade B e apresentaram 82% de similaridade (Figura 21).

Na Figura 21 também estão apresentados os perfis fenotípicos e genotípicos de resistência, grupos filogenéticos, grupos de incompatibilidade plasmidial, conjugação e os pulsotipos das cepas positivas para integron de classe 1 obtidas na coleta de 2015.

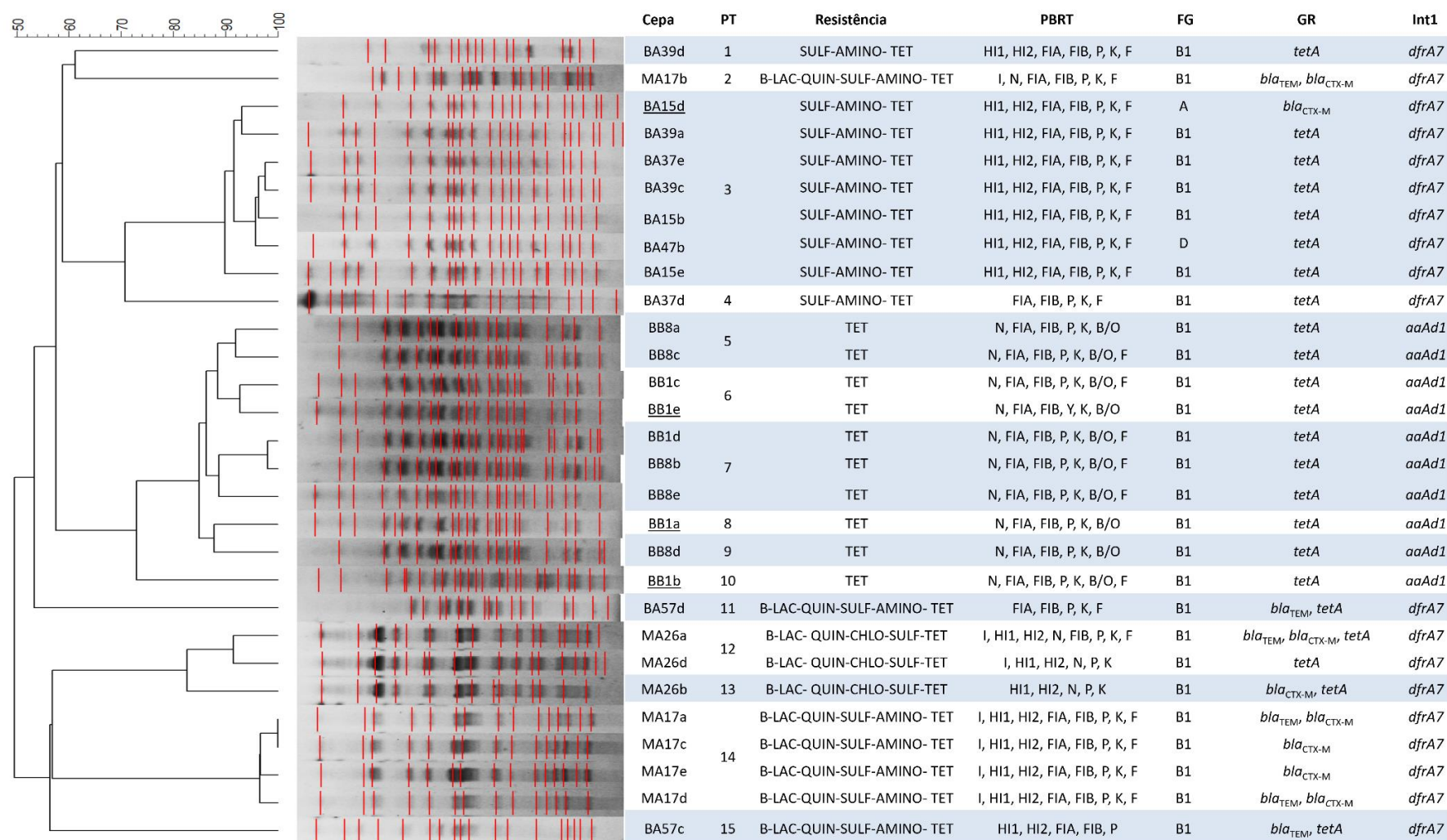


Figura 21. Dendrograma obtido pela técnica de PFGE a partir da digestão enzimática com XbaI do DNA cromossômico de *E. coli* positivas para integron de classe 1 isoladas de moscas e bezerros coabitantes em propriedades leiteiras da região de Botucatu, SP (2015). Padrão gerado por UPGMA, utilizando coeficiente de Dice com tolerância e otimização de 1%. MA: mosca da Propriedade A. BA: bezerro da Propriedade A. BB: bezerro da Propriedade B. PT: pulsotipos; PBRT: *PCR-based replicon typing*; FG: Filogrupos; GR: genes de resistência; Int1: cassete gênico no integron de classe 1; B-LAC: β-lactâmico; QUIN: quinolona; CHLO: cloranfenicol; SULF: sulfonamida + trimetoprim; AMINO: aminoglicosídeo; TET: tetraciclina; não conjugou.

Doze cepas positivas para integron de classe 1 isoladas de moscas e bezerros na Propriedade A nos períodos de inverno e verão em 2019 foram analisadas quanto ao perfil clonal em conjunto com as cepas isoladas anteriormente na mesma propriedade (Figura 22).

De um modo geral foi observada a diversidade genômica e a tendência de agrupamento entre isolados da mesma fonte e período.

Os pulsotipos 1, 3 e 7 são compostos por cepas clones de *E. coli* isoladas de moscas e bezerros na primeira coleta (similaridade genômica $\geq 90\%$). Os pulsotipos 16, composto por uma cepa isolada de mosca no inverno (MI5b) e o 17 por uma cepa isolada de bezerro (BV22a) apresentaram similaridade genômica de 80% e foram considerados intimamente relacionadas (Tenover et al. 1995).

Cepas isoladas de moscas e bezerros apresentaram similaridade entre 68 – 75% em três grupos: pulsotipos 1 e 2 (*E. coli* isoladas de moscas em 2015 e de bezerro no verão) e pulsotipos 10 ao 17 (*E. coli* isoladas de moscas e bezerro no inverno). E os pulsotipos 5 e 6 compostos por uma cepa isolada em 2015 de bezerro (BA39d) e de mosca (MA17b), com similaridade de 62%.

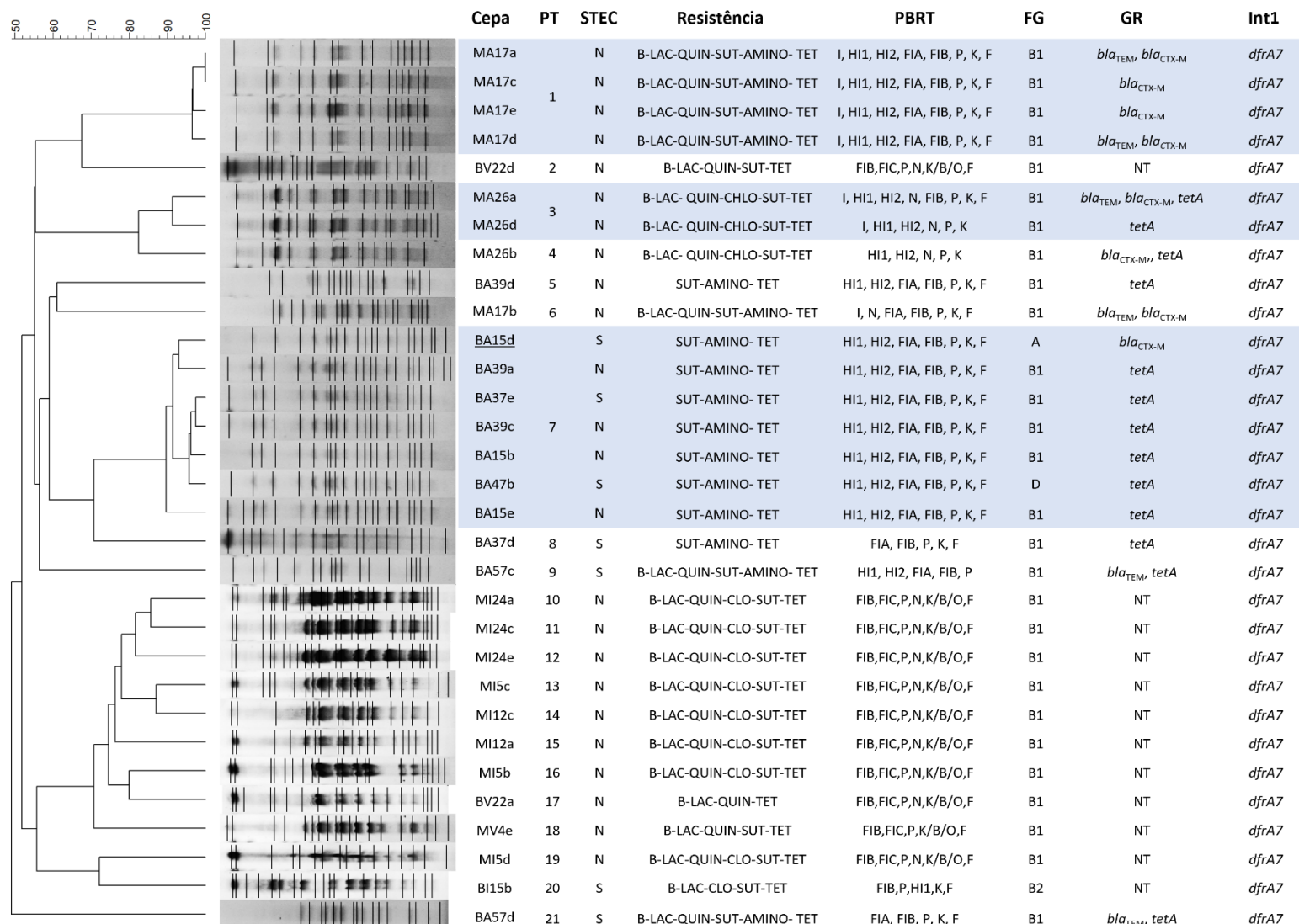


Figura 22. Dendrograma obtido pela técnica de PFGE a partir da digestão enzimática com XbaI do DNA cromossômico de *E. coli* positivas para integron de classe 1 isoladas dípteros muscoides e bezerros da Propriedade A (Botucatu-SP, 2015; 2019). Padrão gerado por UPGMA, utilizando coeficiente de Dice com tolerância e otimização de 1%. Em azul, cepas clones. MA: mosca 2015; BA: bezerro 2015; BI: bezerro inverno; MI: mosca inverno; BV: bezerro verão; MV: mosca verão; PT: pulsotipos; STEC: *E. coli* produtora de toxina Shiga; PBRT: *PCR-based replicon typing*; FG: Filogruppo; GR: genes de resistência; Int1: cassete gênico no integron de classe 1; NT: não testado; B-LAC: beta-lactâmico; QUIN: quinolona; CHLO/CLO: cloranfenicol; SUT: sulfonamida/trimetoprim; AMINO: aminoglicosídeo; TET: tetraciclina; não conjugou

4.4.3. Caracterização molecular de *E. coli* positivas para integron e/ou multirresistentes a antimicrobianos (MDR)

Doze cepas das Propriedades A e B, representativas do estudo, foram selecionadas para a caracterização mais detalhada utilizando dados gerados pelo sequenciamento de genoma completo (WGS): dez cepas apresentando integron de classe 1, nomeadamente MA17a, MA17b, MA26a, MA26b (*E. coli* isoladas da superfície externa de moscas da Propriedade A); BA15d, BA37e, BA57c, BA57d (*E. coli* isoladas das fezes de bezerros saudáveis da Propriedade A); BB1d, BB8c (*E. coli* isoladas das fezes de bezerros saudáveis da Propriedade B); uma cepa MDR isolada das fezes de cão da Propriedade A (CAO4d) e uma cepa MDR e portadora de *mcr-1.1* isolada de fezes de bezerro da Propriedade B (BB6d)⁶. Adicionalmente à presença do integron, as cepas BA15d⁷, BA37e, BA57c, BA57d, BB1d e BB8c foram classificadas como STEC durante o desenvolvimento da parte 3 do presente estudo, porém as cepas BA57c e BA57d perderam o gene *stx*, uma vez que o mesmo não foi identificado no sequenciamento.

O conjunto de fatores de virulência identificados nas 12 cepas (viruloma) pode ser observado na Figura 23, o conjunto de genes de resistência (resistoma), na Figura 24 e os plasmídeos na Figura 25. Nas Tabelas 14, 15 e 16 estão listados os resultados obtidos com as ferramentas disponibilizadas na plataforma do CGE (<https://cge.food.dtu.dk/services>) – genes de resistência, virulência, sequências tipo (ST), sorotipos e grupos filogenéticos (<http://clermontyping.iame-research.center/>).

As cepas MA26a e MA26b (mosca) e a cepa CAO4d apresentaram os mesmos fatores de virulência, assim como as cepas BA57c e BA57d (bezerros) (Figura 23). No total foram identificados 62 fatores de virulência organizados em alguns agrupamentos. Não houve correlação entre grupos de genes e a origem da cepa. Os genes *yehC*, *yehA*, *csgA*, *hlyE*, *terC* e *nlpI* estavam presentes em todas as 12 cepas. As duas cepas de STEC da Propriedade B apresentaram 39/62 fatores de virulência, incluindo o operon *yeh* (adesinas) e genes relacionados à EHEC (*eae*, *efa1*, *tir*, *toxB*, *ehxA*, *katP*, *espP*) (Tabela 16).

Quanto à resistência foram identificados 24 genes adquiridos e seis mutações pontuais nos genes *parC*, *parE* e *gyrA* (Figura 24). As cepas MA17a (mosca) e BA15d (bezerro), MA26a e MA26b (mosca), BB1d e BB8c (bezerros) apresentaram os mesmos

⁶ O sequenciamento da cepa BB6d revelou a presença de um integron de classe 1 distinto das demais cepas positivas para integron da Propriedade B. Os dados estão apresentados na Parte 2 do presente trabalho, uma vez que não era previamente conhecida a presença do integron em questão.

⁷ BA15d: o gene *stx2d* foi identificado no sequenciamento e posteriormente a cepa foi testada quanto a citotoxicidade em células Vero, sendo positiva.

determinantes de resistência (Figura 24). A cepa BA57c apresentou 20/24 determinantes de resistência. Todas as cepas da Propriedade A apresentaram os genes *strA*, *strB* (resistência à estreptomicina) e *sul2* (resistência à sulfonamida). As três cepas da Propriedade B apresentaram o gene *aadA1* (resistência à estreptomicina) (Figura 24 e Tabela 15 e 16). De um modo geral não houve correlação entre os perfis de determinantes de resistência e a origem da cepa.

A cepa MA17b apresentou dez tipos diferentes de Inc/replicons, indicadores da presença de plasmídeos do total de 16 identificados (Figura 25). A análise hierárquica mostrou uma divisão entre os plasmídeos encontrados nas cepas da Propriedade A e aqueles encontrados na Propriedade B, sendo o IncFIB(AP001918) e Col156 encontrados em cepas das duas propriedades. IncQ1 esteve presente em todas as cepas da Propriedade A (9/12), sendo junto com IncFIB(AP001918) (9/10), o mais frequente.

Cepas isoladas de moscas e de bezerros foram alocadas nas sequências tipo ST224 (MA17a, BA15d, BA57c e BA57d) e cepas de moscas e cão na ST58 (MA17b, MA26a, MA26b e CAO4d). As STECs oriundas da Propriedade B foram atribuídas à ST21. Os sorotipos identificados foram O8:H8 (MA17b) e O45:H2 (BA15d) (Tabelas 14, 15 e 16).

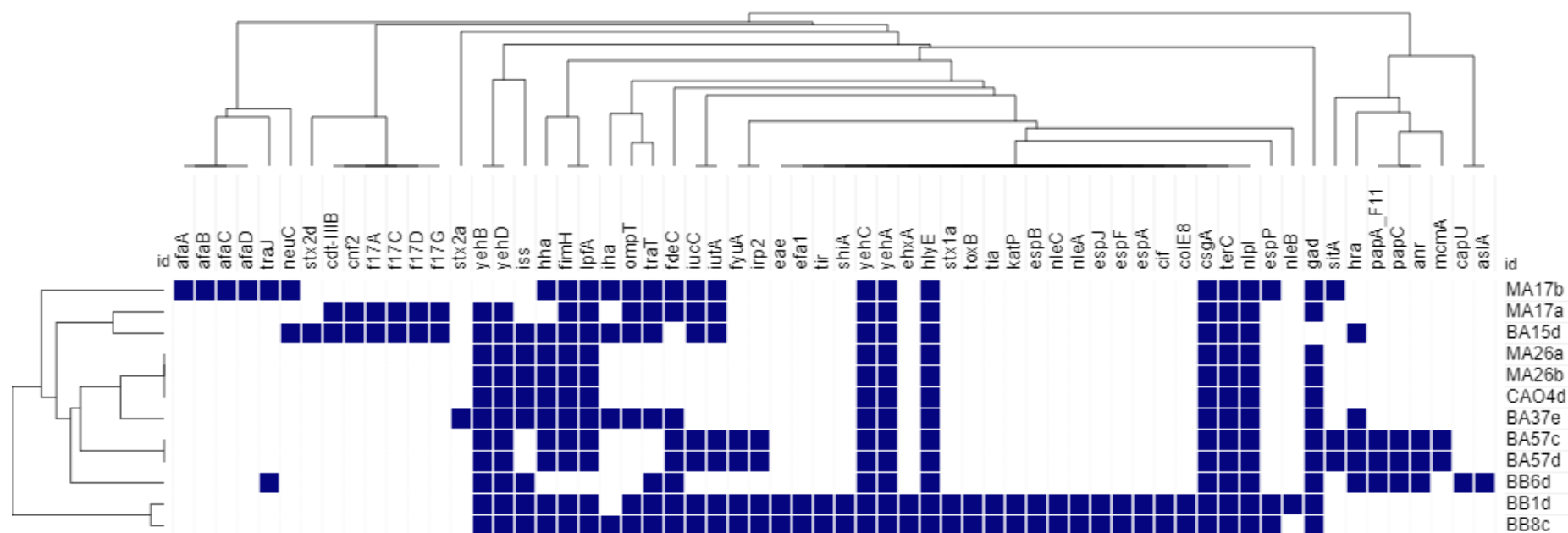


Figura 23. Agrupamento hierárquico e *heatmap* do viruloma de *Escherichia coli* isoladas da superfície externa de moscas e fezes de e cão coabitantes em duas propriedades leiteiras (Botucatu -SP, 2015). As colunas representam os fatores de virulência encontrados e as linhas as cepas analisadas. Células em azul indicam a presença do gene. Agrupamento e figura gerados com <https://software.broadinstitute.org/Morpheus>, matriz de distância binária e correlação de Pearson. MA, BA, CAO: moscas, bezerro e cão da propriedade A; BB: bezerro propriedade B. Fatores de virulência: toxina: *stx1a*, *stx2a*, *stx2d*, *cdt-IIIb*, *cnf2*, *toxB*; hemolisina: *hha*, *hlyE*, *ehxA*; adesinas: *fimH*, *f17A*, *f17C*, *f17D*, *f17G*, *lpfA*, *yehA*, *yehB*, *yehC*, *yehD*, *afaA*, *afaB*, *afaC*, *afaD*, *fdeC*, *iha*, *hra*, *eae*, *efa1*, *tir*, *papA_F11*, *papC*; captação de ferro: *iucC*, *iutA*, *sitA*, *fyuA*, *irp2*; transportador de chiquimato: *shiA*; proteína de membrana externa: *ompT*, *traT*, *nlpI*; resistência a telurito: *terC*; glutamato descarboxilase: *gad*; biofilme: *csgA*; cápsula: *neuC*; conjugação: *traJ*; sobrevivência sérica: *iss*; colicina: *colE8*, *mcmA*; Sistema secreção tipo III: *cif*, *espA*, *espF*; efetor LEE não codificado: *nleA*, *nleB*, *nleC*; serina protease: *espP*, *espB*; catalase peroxidase: *katP*; hexosiltransferase: *capU*; invasina: *asiA*, *tia*; proteína regulatória: *anr*.

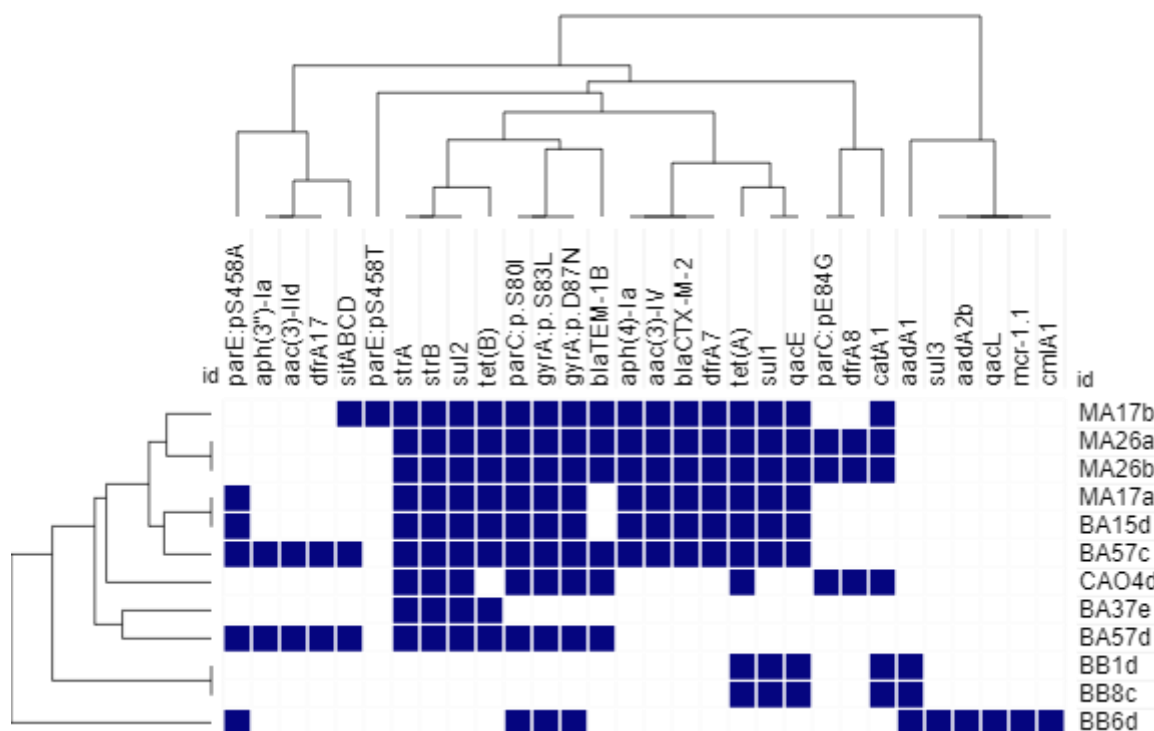


Figura 24. Agrupamento hierárquico e *heatmap* do resistoma de *Escherichia coli* isoladas da superfície externa de moscas e fezes de e cão coabitantes em duas propriedades leiteiras (Botucatu -SP, 2015). As colunas representam os genes de resistência encontrados e as linhas as cepas analisadas. Células em azul indicam a presença do gene. Agrupamento e figura gerados com <https://software.broadinstitute.org/Morpheus>, matriz de distância binária e correlação de Pearson. MA, BA, CAO: moscas, bezerro e cão da propriedade A; BB: bezerro propriedade B. Genes de resistência a antimicrobianos: beta-lactâmico: *bla*_{TEM-1B}, *bla*_{CTX-M-2}; aminoglicosídeo: *strA*, *strB*, *aac(3)-IId*, *aac(3)-IV*, *aph(3'')-Ia*, *aph(4)-Ia*; *aadA1*, *aadA2b*; quinolona: *gyrA* and *parC* mutações; sulfonamida: *sul1*, *sul2*, *sul3*; trimethoprim: *dfrA7*, *dfrA8*, *dfrA17*; tetraciclina: *tetA*, *tetB*; quaternário de amônio: *qacE*, *qacL*; cloranfenicol: *catA1*, *cmlA1*; polimixina: *mcr-1.1*; peróxido de hidrogênio: *sitABCD*.

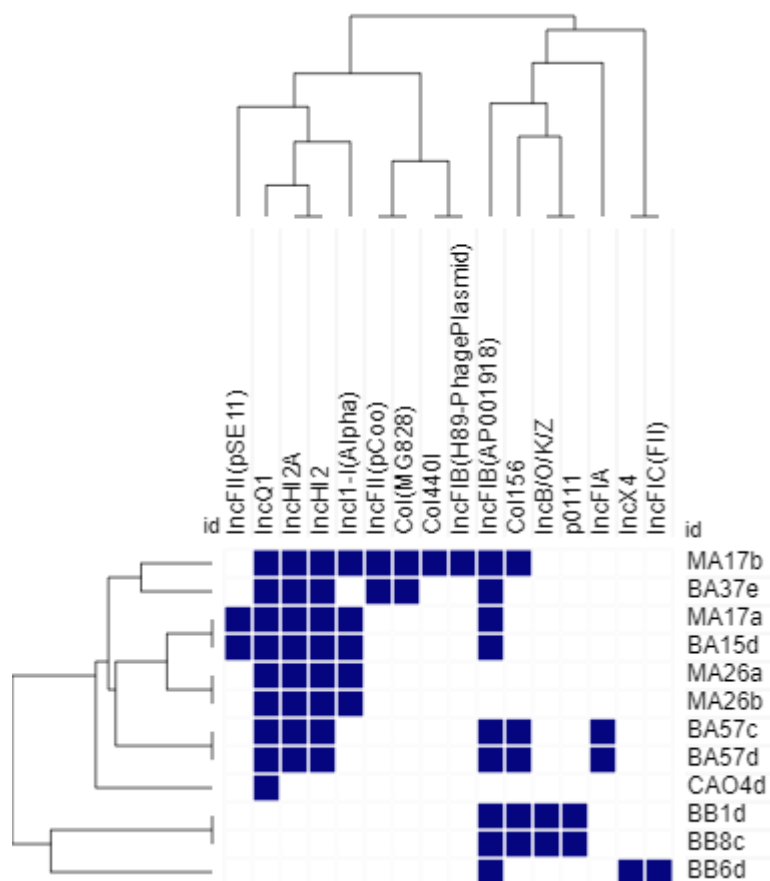


Figura 25. Agrupamento hierárquico e *heatmap* dos plasmídeos (Inc/replicon) de *Escherichia coli* isoladas da superfície externa de moscas e fezes de e cão coabitantes em duas propriedades leiteiras (Botucatu -SP, 2015). As colunas representam os plasmídeos encontrados e as linhas as cepas analisadas. Células em azul indicam a presença. Agrupamento e figura gerados com <https://software.broadinstitute.org/Morpheus>, matriz de distância binária e correlação de Pearson. MA, BA, CAO: moscas, bezerro e cão da propriedade A; BB: bezerro propriedade B.

Tabela 14. *Escherichia coli* positivas para integron de classe 1 isoladas de dípteros muscoides na Propriedade A (Botucatu – SP, 2015). Resistoma, viruloma, sequências tipo (ST), sorotipagem e plasmídeos.

Cepa	Resistência	Genes de resistência	Fatores de virulência	MLST	Sorotipagem	Plasmídeos	FG
MA17a	B-LAC-QUIN-SUT-AMINO-TET	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>aph(4)-Ia</i> , <i>parC</i> :p.S80I, <i>gyrA</i> :p.S83L, <i>gyrA</i> :p.D87N, <i>parE</i> :p.S458A, <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA7</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>bla</i> _{CTXM-2} , <i>qacE</i>	<i>cdt-IIIIB</i> , <i>cnf2</i> , <i>hlyE</i> , <i>fimH</i> , <i>f17A</i> , <i>f17C</i> , <i>f17D</i> , <i>f17G</i> , <i>lpfA</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i> , <i>fdec</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>ompT</i> , <i>traT</i> , <i>nlpI</i> , <i>terC</i> , <i>gad</i> , <i>csgA</i>	ST224	O45:H23	IncHI2, IncI1-I(Alpha), IncQ1, IncHI2A, IncFII(pSE11), IncFIB(AP001918)	B1
MA17b	B-LAC-QUIN-SUT-AMINO-TET	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>aph(4)-Ia</i> , <i>parC</i> :p.S80I, <i>gyrA</i> :p.S83L, <i>gyrA</i> :p.D87N, <i>parE</i> :p.S458T, <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA7</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>bla</i> _{CTXM-2} , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>qacE</i> , <i>sitABCD</i> , <i>catA1</i>	<i>hha</i> , <i>hlyE</i> , <i>fimH</i> , <i>lpfA</i> , <i>yehA</i> , <i>yehC</i> , <i>afaA</i> , <i>afaB</i> , <i>afaC</i> , <i>afaD</i> , <i>fdec</i> , <i>iha</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>sitA</i> , <i>ompT</i> , <i>traT</i> , <i>nlpI</i> , <i>terC</i> , <i>gad</i> , <i>csgA</i> , <i>neuC</i> , <i>traJ</i> , <i>espP</i>	ND	O8:H8	IncQ1, IncHI2A, IncHI2, IncI1-I(Alpha), IncFII(pCoo), Col(MG828), Col440I, IncFIB(H89-PhagePlasmid), IncFIB(AP001918), Col156	B1
MA26a	B-LAC-QUIN-CLO-SUT-TET	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>aph(4)-Ia</i> , <i>gyrA</i> :p.S83L, <i>gyrA</i> :p.D87N, <i>parC</i> :p.S80I, <i>parC</i> :p.E84G, <i>dfrA7</i> , <i>dfrA8</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>bla</i> _{CTXM-2} , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>qacE</i> , <i>catA1</i>	<i>hha</i> , <i>hlyE</i> , <i>fimH</i> , <i>lpfA</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i> , <i>nlpI</i> , <i>terC</i> , <i>gad</i> , <i>csgA</i> , <i>iss</i> ,	ST58	ND	IncHI2, IncI1-I(Alpha), IncHI2A, IncQ1	B1
MA26b	B-LAC-QUIN-CLO-SUT-TET	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>aph(4)-Ia</i> , <i>gyrA</i> :p.S83L, <i>gyrA</i> :p.D87N, <i>parC</i> :p.S80I, <i>parC</i> :p.E84G, <i>dfrA7</i> , <i>dfrA8</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>bla</i> _{CTXM-2} , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>qacE</i> , <i>catA1</i>	<i>hha</i> , <i>hlyE</i> , <i>fimH</i> , <i>lpfA</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i> , <i>nlpI</i> , <i>terC</i> , <i>gad</i> , <i>csgA</i> , <i>iss</i> ,	ST58	ND	IncHI2, IncI1-I(Alpha), IncHI2A, IncQ1	B1

MLST: *Multilocus Sequence typing*. FG: filogruppo. MA: mosca propriedade A. B-LAC: beta-lactâmico; QUIN: quinolona; CLO: cloranfenicol; SUT: sulfonamida/trimetoprim; AMINO: aminoglicosídeo; TET: tetraciclina. Genes de resistência a antimicrobianos: beta-lactâmico: *bla*_{TEM-1B}, *bla*_{CTXM-2}; aminoglicosídeo: *strA*, *strB*, *aac(3)-IId*, *aac(3)-IV*, *aph(3'')-Ia*, *aph(4)-Ia*; *aadA1*, *aadA2b*; quinolona: *gyrA* and *parC* mutações; sulfonamida: *sul1*, *sul2*, *sul3*; trimetoprim: *dfrA7*, *dfrA8*, *dfrA17*; tetraciclina: *tetA*, *tetB*; quaternário de amônio: *qacE*, *qacL*; cloranfenicol: *catA1*, *cmlA1*; polimixina: *mcr-1.1*; peróxido de hidrogênio: *sitABCD*. Fatores de virulência: toxina: *stx1a*, *stx2a*, *stx2d*, *cdt-IIIIB*, *cnf2*, *toxB*; hemolisina: *hha*, *hlyE*, *ehxA*; adesinas: *fimH*, *f17A*, *f17C*, *f17D*, *f17G*, *lpfA*, *yehA*, *yehB*, *yehC*, *yehD*, *afaA*, *afaB*, *afaC*, *afaD*, *fdeC*, *iha*, *hra*, *eae*, *efa1*, *tir*, *papA_F11*, *papC*; captação de ferro: *iucC*, *iutA*, *sitA*, *fyuA*, *irp2*; transportador de chiquimato: *shiA*; proteína de membrana externa: *ompT*, *traT*, *nlpI*; resistência a telurito: *terC*; glutamato descarboxilase: *gad*; biofilme: *csgA*; cápsula: *neuC*; conjugação: *traJ*; sobrevivência sérica: *iss*; colicina: *colE8*, *mcmA*; Sistema secreção tipo III: *cif*, *espA*, *espF*; efetor LEE não codificado: *nleA*, *nleB*, *nleC*; serina protease: *espP*, *espB*; catalase peroxidase: *katP*; hexosiltransferase: *capU*; invasina: *aslA*, *tia*; proteína regulatória: *anr*.

Tabela 15. *Escherichia coli* positivas para integron de classe 1 isoladas de bezerros e multirresistente a antimicrobianos isolada de cão na Propriedade A (Botucatu – SP, 2015). Resistoma, viruloma, sequências tipo (ST), sorotipagem e plasmídeos.

Cepa	Resistência	Genes de resistência	Fatores de virulência	MLST	Sorotipagem	Plasmídeos	FG
BA15d	SUT-AMINO-TET	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>aph(4)-Ia</i> , <i>gyrA</i> :p.S83L, <i>gyrA</i> :p.D87N, <i>parC</i> :p.S80I, <i>parE</i> :p.S458A, <i>dfrA7</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>qacE</i>	<i>stx2d</i> , <i>cdt-IIIb</i> , <i>cnf2</i> , <i>hha</i> , <i>hlyE</i> , <i>fimH</i> , <i>f17A</i> , <i>f17C</i> , <i>f17D</i> , <i>f17G</i> , <i>lpfA</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i> , <i>iha</i> , <i>hra</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>ompT</i> , <i>traT</i> , <i>nlpI</i> , <i>terC</i> , <i>csgA</i> , <i>neuC</i> , <i>iss</i> ,	ST224	O45:H2	IncHI2, IncI1-I(Alpha), IncHI2A, IncQ1, IncFIB(AP001918), IncFII(PSE11)	B1
BA37e	SUT- TET	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tetB</i> ,	<i>stx2a</i> , <i>hha</i> , <i>hlyE</i> , <i>fimH</i> , <i>lpfA</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i> , <i>fdec</i> , <i>iha</i> , <i>hra</i> , <i>ompT</i> , <i>traT</i> , <i>nlpI</i> , <i>terC</i> , <i>gad</i> , <i>csgA</i> , <i>iss</i> ,	ST332	ND	IncQ1, IncHI2A, IncHI2, IncFII(pCoo), Col(MG828), IncFIB(AP001918)	B1
BA57c	B-LAC-QUIN-SUT-AMINO-TET	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aph(4)-Ia</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aac(3)-IId</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>gyrA</i> :p.S83L, <i>gyrA</i> :p.D87N, <i>parC</i> :p.S80I, <i>parE</i> :p.S458A, <i>dfrA7</i> , <i>dfrA17</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>sitABCD</i> , <i>qacE</i>	<i>hha</i> , <i>hlyE</i> , <i>fimH</i> , <i>lpfA</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i> , <i>fdec</i> , <i>hra</i> , <i>papA_F11</i> , <i>papC</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>sitA</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>nlpI</i> , <i>terC</i> , <i>gad</i> , <i>csgA</i> , <i>mcmA</i> , <i>anr</i>	ST224	O11:H23	IncHI2, IncHI2A, IncQ1, IncFIB(AP001918), IncFIA, Col156	B1
BA57d	B-LAC-QUIN-SUT-AMINO-TET	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aac(3)-IId</i> , <i>gyrA</i> :p.S83L, <i>gyrA</i> :p.D87N, <i>parC</i> :p.S80I, <i>parE</i> :p.S458A, <i>dfrA17</i> , <i>sul2</i> , <i>tetB</i> , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>sitABCD</i> ,	<i>hha</i> , <i>hlyE</i> , <i>fimH</i> , <i>lpfA</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i> , <i>fdec</i> , <i>hra</i> , <i>papA_F11</i> , <i>papC</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>sitA</i> , <i>fyuA</i> , <i>irp2</i> , <i>nlpI</i> , <i>terC</i> , <i>gad</i> , <i>csgA</i> , <i>mcmA</i> , <i>anr</i>	ST224	O11:H23	IncHI2, IncHI2A, IncQ1, IncFIB(AP001918), IncFIA, Col156	B1
CAO4d	B-LAC- QUIN-CLO-SUT-TET	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>gyrA</i> :p.S83L, <i>gyrA</i> :p.D87N, <i>parC</i> :p.S80I, <i>parC</i> :p.E84G, <i>sul2</i> , <i>dfrA8</i> , <i>tetA</i> , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>catA1</i>	<i>hha</i> , <i>hlyE</i> , <i>fimH</i> , <i>lpfA</i> , <i>yehA</i> , <i>yehB</i> , <i>yehC</i> , <i>yehD</i> , <i>nlpI</i> , <i>terC</i> , <i>gad</i> , <i>csgA</i> , <i>iss</i> ,	ST58	ND	IncQ1	B1

MLST: *Multilocus Sequence typing*. FG: filogrupo. BA: bezerros propriedade A; CAO: cão propriedade A. B-LAC: beta-lactâmico; QUIN: quinolona; CLO: cloranfenicol; SUT: sulfonamida/trimetoprim; AMINO: aminoglicosídeo; TET: tetraciclina. Genes de resistência a antimicrobianos: beta-lactâmico: *bla*_{TEM-1B}, *bla*_{CTX-M-2}; aminoglicosídeo: *strA*, *strB*, *aac(3)-IId*, *aac(3)-IV*, *aph(3')-Ia*, *aph(4)-Ia*; *aadA1*, *aadA2b*; quinolona: *gyrA* e *parC* mutações; sulfonamida: *sul1*, *sul2*, *sul3*; trimetoprim: *dfrA7*, *dfrA8*, *dfrA17*; tetraciclina: *tetA*, *tetB*; quaternário de amônio: *qacE*, *qacL*; cloranfenicol: *catA1*, *cmlA1*; polimixina: *mcr-1.1*; peróxido de hidrogênio: *sitABCD*. Fatores de virulência: toxina: *stx1a*, *stx2a*, *stx2d*, *cdt-IIIb*, *cnf2*, *toxB*; hemolisina: *hha*, *hlyE*, *ehxA*; adesinas: *fimH*, *f17A*, *f17C*, *f17D*, *f17G*, *lpfA*, *yehA*, *yehB*, *yehC*, *yehD*, *afaA*, *afaB*, *afaC*, *afaD*, *fdeC*, *iha*, *hra*, *eae*, *efa1*, *tir*, *papA_F11*, *papC*; captação de ferro: *iucC*, *iutA*, *sitA*, *fyuA*, *irp2*; transportador de chiquimato: *shiA*; proteína de membrana externa: *ompT*, *traT*, *nlpI*; resistência a telurito: *terC*; glutamato descarboxilase: *gad*; biofilme: *csgA*; cápsula: *neuC*; conjugação: *traJ*; sobrevivência sérica: *iss*; colicina: *colE8*, *mcmA*; Sistema secreção tipo III: *cif*, *espA*, *espF*; efetor LEE não codificado: *nleA*, *nleB*, *nleC*; serina protease: *espP*, *espB*; catalase peroxidase: *katP*; hexosiltransferase: *capU*; invasina: *aslA*, *tia*; proteína regulatória: *anr*.

Tabela 16. *Escherichia coli* positivas para integron de classe 1 isoladas de bezerros na Propriedade B (Botucatu – SP, 2015). Resistoma, viruloma, sequências tipo (ST), sorotipagem e plasmídeos.

Cepa	Resistência	Genes de resistência	Fatores de virulência	MLST	Sorotipagem	Plasmídeos	FG
BB1d	TET	<i>aadA1, sul1, tetA, qacE, catA1</i>	<i>stx1a, eae, efa1, tir, toxB, hha, hlyE, ehxA, fimH, lpfA, yehA, yehB, yehC, yehD, fdec, iucC, iutA, fyuA, irp2, shiA, ompT, traT, nlpI, terC, gad, csgA, iss, colE8, cif, espA, espB, espF, espJ, espP, nleA, nleB, nleC, katP, tia</i>	ST21	O118/O151:H16	IncB/O/K/Z, p0111, IncFIB(AP001918), Col156	B1
BB8c	TET	<i>aadA1, sul1, tetA, qacE, catA1</i>	<i>stx1a, eae, efa1, tir, toxB, hha, hlyE, ehxA, fimH, lpfA, yehA, yehB, yehC, yehD, fdec, iha, iucC, iutA, fyuA, irp2, shiA, ompT, traT, nlpI, terC, gad, csgA, iss, colE8, cif, espA, espB, espF, espJ, espP, nleA, nleC, katP, tia</i>	ST21	O118/O151:H16	IncB/O/K/Z, p0111, IncFIB(AP001918), Col156	B1
BB6d	B-LAC-CIP-ENR-CLO	<i>aadA1, aadA2b, aac(6')-Ib7, mcr-1.1, sul3, gyrA:p.S83L, gyrA:p.D87N, parC:p.S80I, parE:p.S458A, qacL, cmlA1</i>	<i>hlyE, yehA, yehB, yehC, yehD, fdec, hra, papA_F11, papC, traT, nlpI, terC, gad, csgA, traJ, iss, capU, aslA, anr</i>	ST167	O101:H9	IncX4, IncFIB(AP001918), IncFIC(FII)	A

MLST: *Multilocus Sequence typing*. FG: filogruppo. BB: bezerro propriedade B. B-LAC: beta-lactâmico; QUIN: quinolona; CLO: cloranfenicol; SUT: sulfonamida/trimetoprim; AMINO: aminoglicosídeo; TET: tetraciclina. Genes de resistência a antimicrobianos: beta-lactâmico: *bla_{TEM-1B}*, *bla_{CTXM-2}*; aminoglicosídeo: *strA, strB, aac(3)-IId, aac(3)-IV, aac(6')-Ib7, aph(3'')-Ia, aph(4)-Ia; aadA1, aadA2b*; quinolona: *gyrA* and *parC* mutações; sulfonamida: *sul1, sul2, sul3*; trimetoprim: *dfrA7, dfrA8, dfrA17*; tetraciclina: *tetA, tetB*; quaternário de amônio: *qacE, qacL*; cloranfenicol: *catA1, cmlA1*; polimixina: *mcr-1.1*; peróxido de hidrogênio: *sitABCD*. Fatores de virulência: toxina: *stx1a, stx2a, stx2d, cdt-IIIb, cnf2, toxB*; hemolisina: *hha, hlyE, ehxA*; adesinas: *fimH, f17A, f17C, f17D, f17G, lpfA, yehA, yehB, yehC, yehD, afaA, afaB, afaC, afaD, fdeC, iha, hra, eae, efa1, tir, papA_F11, papC*; captação de ferro: *iucC, iutA, sitA, fyuA, irp2*; transportador de chiquimato: *shiA*; proteína de membrana externa: *ompT, traT, nlpI*; resistência a telurito: *terC*; glutamato descarboxilase: *gad*; biofilme: *csgA*; cápsula: *neuC*; conjugação: *traJ*; sobrevivência sérica: *iss*; colicina: *colE8, mcmA*; Sistema secreção tipo III: *cif, espA, espF*; efetor LEE não codificado: *nleA, nleB, nleC*; serina protease: *espP, espB*; catalase peroxidase: *katP*; hexosiltransferase: *capU*; invasina: *aslA, tia*; proteína regulatória: *anr*.

4.4.4. Caracterização do integron de classe 1

O ambiente genético do integron de classe 1 presente nas cepas isoladas dos animais das propriedades A e B foi investigado por meio da análise dos dados obtidos pelo sequenciamento genômico completo (WGS) das cepas.

Propriedade A

O integron completo ou parcial foi identificado nas cepas MA17a, MA26a, MA26b, BA15d e BA57c (Figura 26). As cepas MA17b apresentou os componentes do integron fragmentados em diferentes *contigs* e as cepas BA57d e BA37e não apresentaram os genes indicativos de integron.

O integron de classe 1 analisado apresentou a estrutura principal *intI1-dfrA7-qacEΔ1-sul1-bla_{CTX-M-2}-qacEΔ1-sul1-tniB-tniA*, exceto pela cepa BA57c que parece ter perdido o gene *intI1*. Nas cepas MA17a e BA15d essa estrutura principal, provavelmente mobilizada por *tniB* e/ou *tniA*, está associado a outros genes e elementos móveis constituindo uma sequência genética maior de aproximadamente 45 kpb (Figura 26).

Na sequência de 45 kpb foram encontrados genes de resistência à tetraciclina (*tetA*), a aminoglicosídeo (*aph(4)-Ia* e *aac(3)-IV*) e ao mercúrio (operon *mer*), além de transposases da família Tn3 (TnAs1) e IS6 (ISR1e7) (Figura 26).

Apesar dos resultados do presente estudo não identificarem a associação do integron em plasmídeo, a sequência de 45 kpb apresentou 99,82% de identidade e 100% de cobertura com a sequência de um plasmídeo CP031284.1 (NCBI). Interessantemente, o alinhamento com o plasmídeo referência mostrou fragmentação da sequência a partir do gene *intI1* ao *smc* e de *hns* a IS6 e uma proteína hipotética (Figura 27). Além disso, as regiões do integron foram reconhecidas como regiões de transferência horizontal de genes (HGT) no plasmídeo referência (Figura 27).

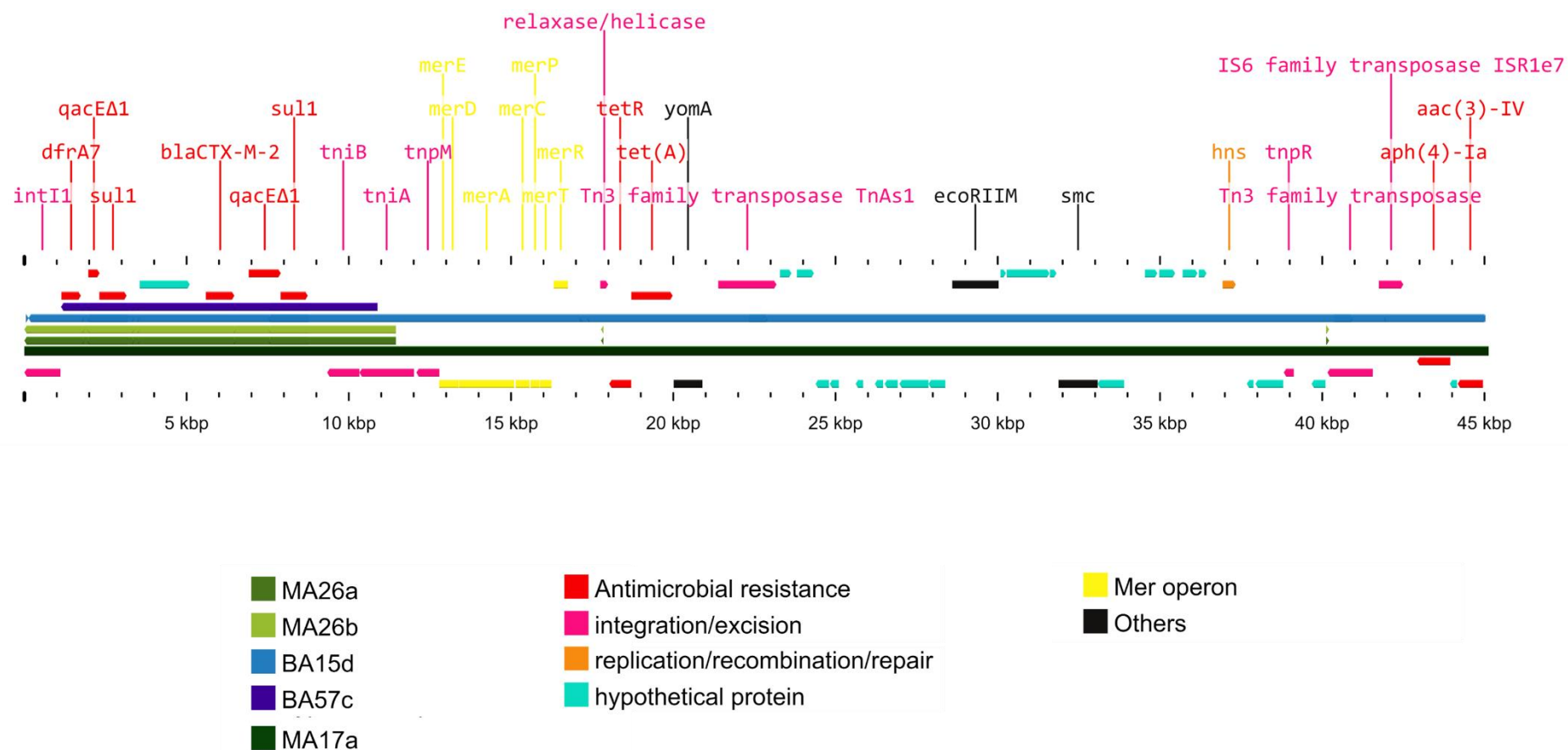


Figura 26. Integron de classe 1 circulante em *Escherichia coli* isoladas da superfície externa de dípteros muscoides e fezes de bezerros na Propriedade A. Mapa elaborado com Proksee (<https://proksee.ca/>).

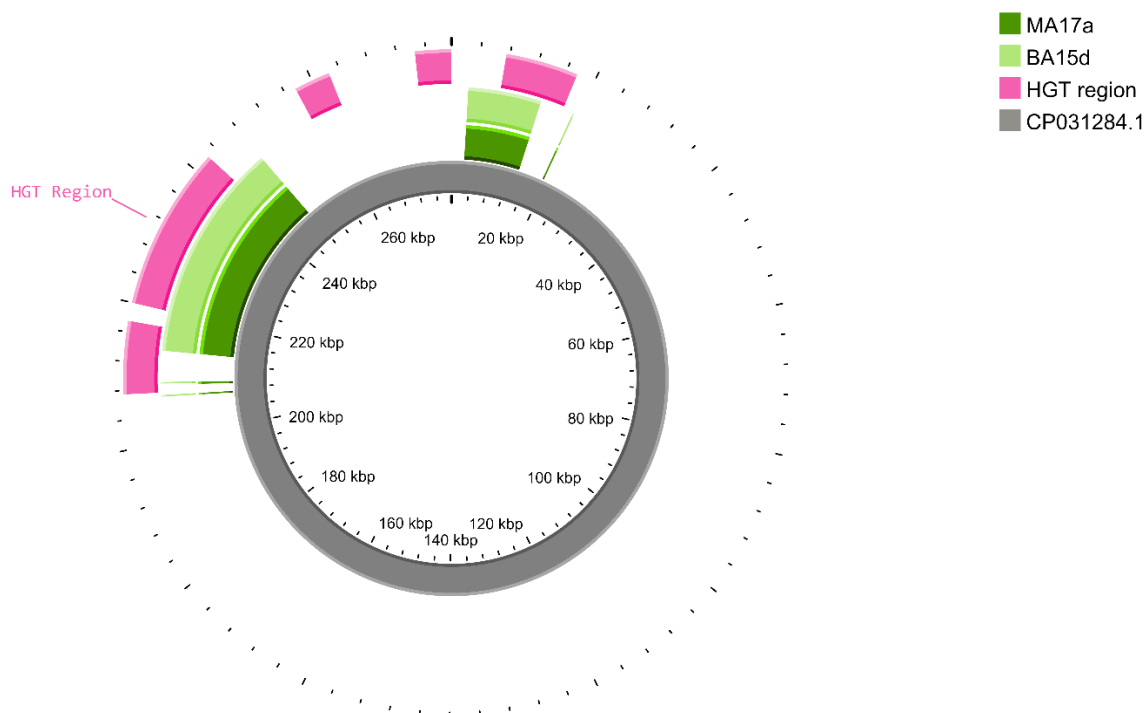


Figura 27. Alinhamento das sequências de integron de classe 1 encontradas nas cepas de mosca (MA17a) e bezerro (BA15d) com o plasmídeo referência CP031284.1. Mapa elaborado com Proksee (<https://proksee.ca/>) e BLAST. HGT region: região de transferência horizontal de genes.

Propriedade B

As cepas BB1d e BB8c isoladas de bezerros apresentaram integron de classe 1 inserido em um plasmídeo p0111 de 112.251 pb. A estrutura do integron foi composta pelos genes *intI1-aadA1-qacEΔ1-sul1*, flanqueado por transposases da família Tn3 (TnAs3) e IS21 (IS1326) (Figura 28).

O plasmídeo p0111 (BB1d/BB8c) apresentou 99,37% de identidade e 80% de cobertura com o plasmídeo depositado em AP10962.1 (NCBI) e 99,72% de identidade e 81% de cobertura com o plasmídeo AP027192.1 (NCBI). O alinhamento entre os plasmídeos do presente estudo e os de referência mostrou uma região de transferência horizontal de genes correspondente a região do integron de classe 1, presente em BB1d e BB8c e ausente nas sequências de referência (Figura 29).

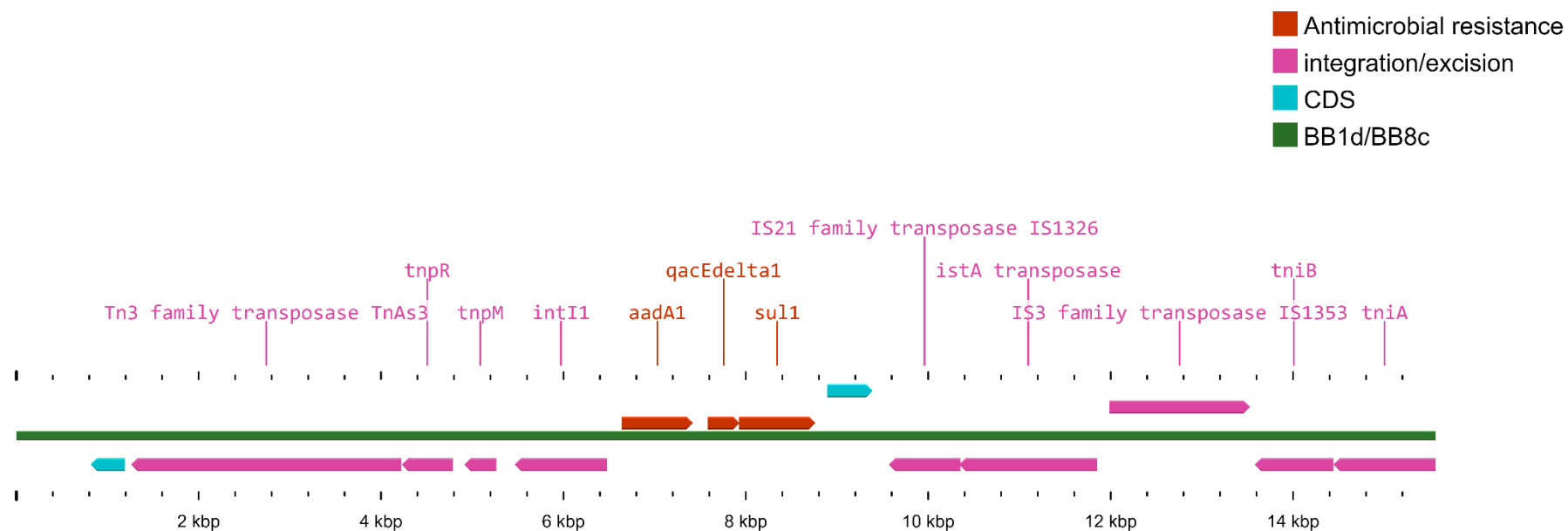


Figura 28. Integron de classe 1 em *Escherichia coli* isoladas de fezes de bezerros na Propriedade B. Mapa elaborado com Proksee (<https://proksee.ca/>).

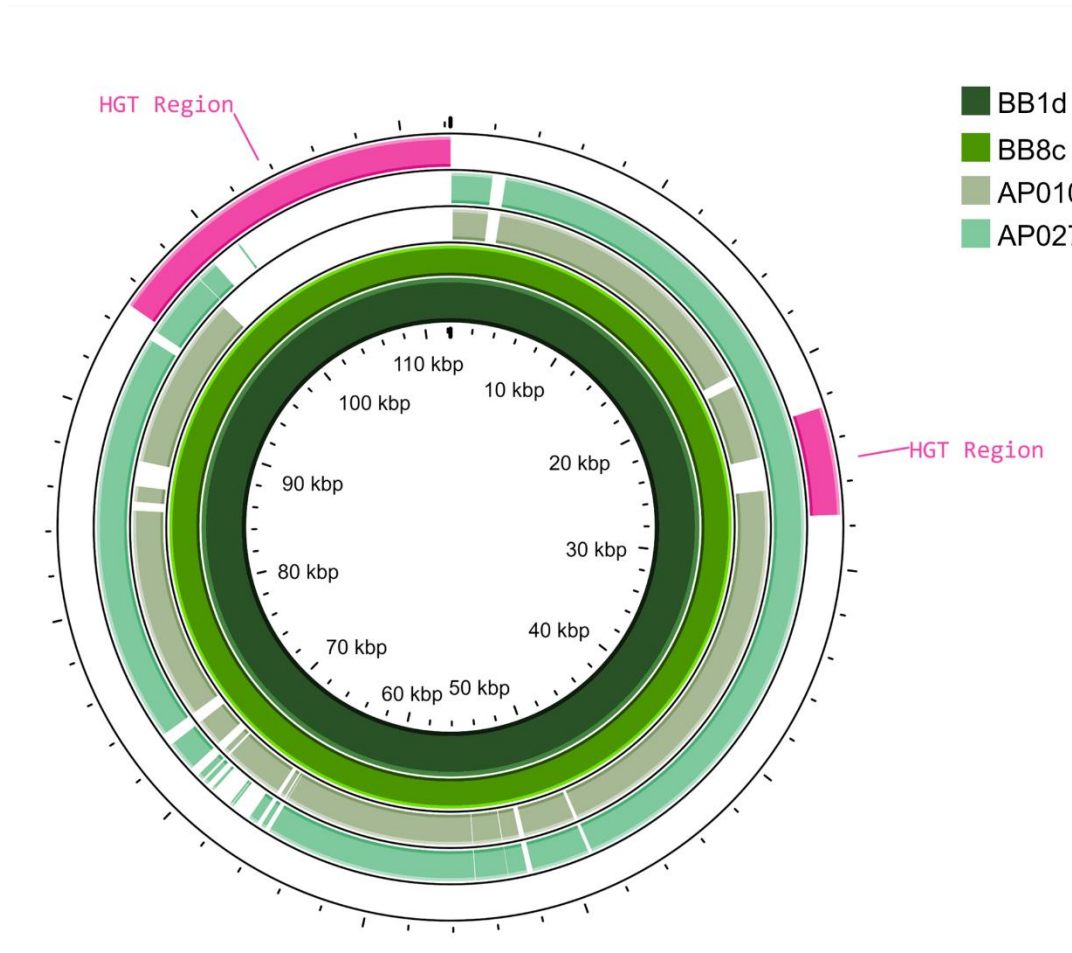


Figura 29. Alinhamento do plasmídeo p0111 presente nas cepas BB1d e BB8c portador de integron de classe 1 com os plasmídeos AP010962.1 e AP027192.1. Mapa elaborado com Proksee (<https://proksee.ca/>) e BLAST. HGT region: região de transferência horizontal de genes.

4.4.5. Análise filogenética de *E. coli* positivas para integron e/ou multirresistentes a antimicrobianos (MDR)

A Figura 30 ilustra as relações filogenéticas entre as cepas selecionadas para o sequenciamento do genoma completo. É possível identificar a presença de cepas de *E. coli* clones provenientes de diferentes animais no clado formado pelas cepas MA26b, MA26a e CAO4d identificadas como ST58, sendo também o clado mais derivado, e no clado formado pelas cepas MA17a e BA15d, ambas ST224.

A cepa portadora do gene *mcr-1.1* (BB6d) é grupo irmão da cepa de *E. coli* K12 utilizada como grupo externo. As cepas da Propriedade A alocadas na sequência tipo ST224 formam um clado pouco divergente formado por dois grupos irmãos compostos pelos clones BA57c, BA57d e MA17a, BA15d. As cepas positivas para integron da Propriedade B (BB1d e BB8c) também apresentaram a mesma sequência tipo (ST21) e foram consideradas clones.

A cepa BA37e pertence a uma linhagem distinta, sendo grupo irmão das cepas da BB1d, BB8c, MA17b, CAO4d, MA26a e MA26b.

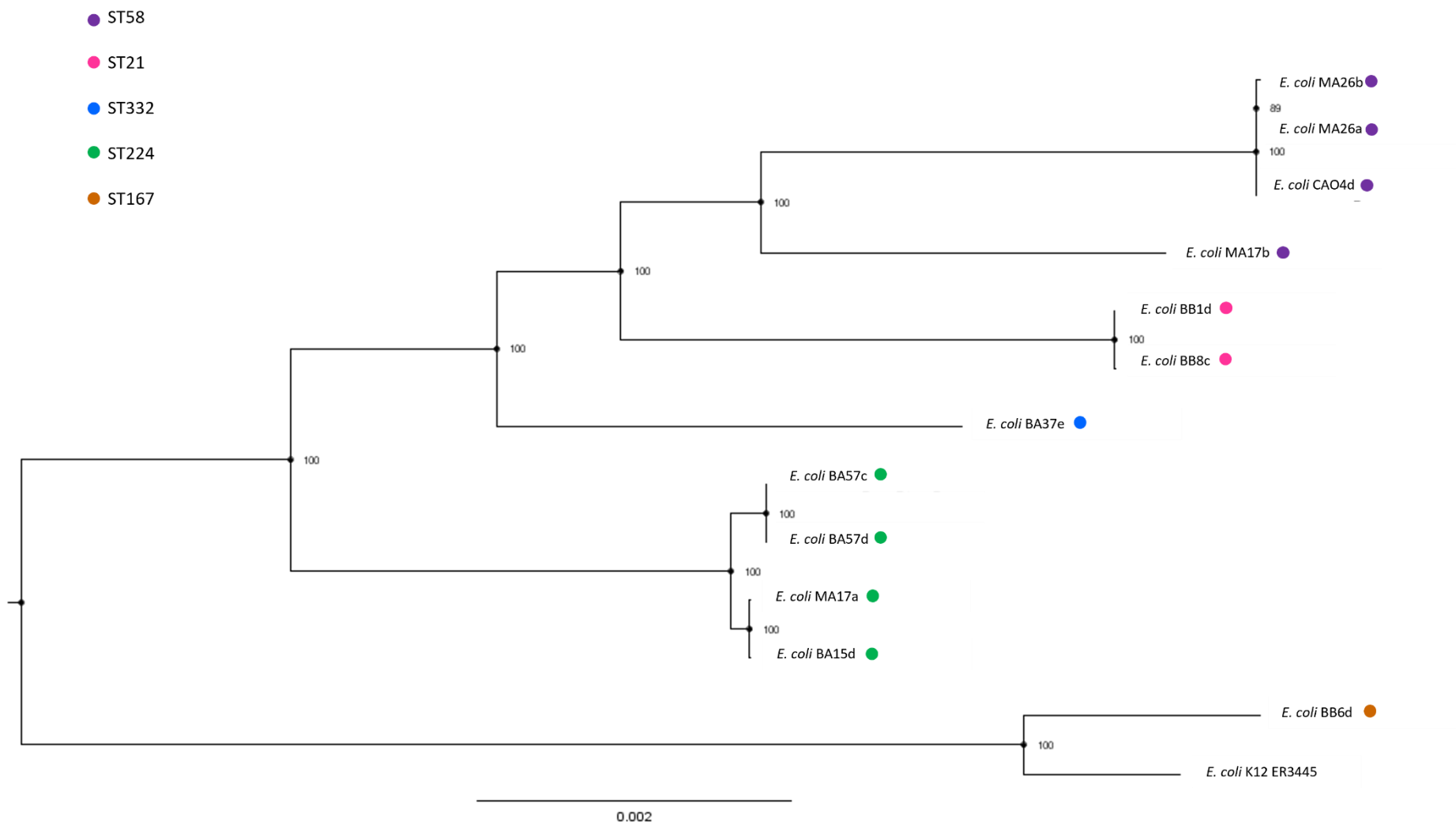


Figura 30. Árvore filogenética de *Escherichia coli* positiva para integron de classe 1 e/ou multirresistente a antimicrobianos isoladas da superfície externa de dípteros muscoides, fezes de bezerros e cão em duas propriedades leiteiras inferida por máxima verossimilhança com base no genoma central (cgMLST, 1000 genes) (Botucatu -SP, 2015). Propriedade A: moscas (MA), bezerros (BA) e cão (CAO); Propriedade B: bezerros (BB). Os valores de *bootstrap* estão apresentados nos nós. Análise realizada em <https://www.bv-brc.org/> e imagem da árvore visualizada com FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

A disseminação da resistência aos antimicrobianos no ambiente envolve vários aspectos como o uso não terapêutico de antimicrobianos na agropecuária, contaminação da água e solo, contato entre humanos e animais, mobilidade de pessoas (viagens) e animais (exportação e migração de animais), e nos últimos anos as moscas têm ganhado destaque nesse cenário como potenciais reservatórios e vetores de resistência (Olaru et al. 2023).

Nesse sentido, o tema permeia o conceito de Saúde Única, uma vez que interliga as esferas humana, animal e ambiental (Olaru et al. 2023). Entender como as bactérias e/ou os determinantes genéticos de resistência cruzam essas esferas, é fundamental para a compreensão da dinâmica da disseminação da resistência a antimicrobianos (Larsson e Flach 2022), de modo que ações preventivas podem ser direcionadas de maneira mais efetiva.

No presente estudo foi realizada a caracterização da resistência a antimicrobianos e a pesquisa de integrons em *E. coli* isoladas de animais conviventes em propriedades leiteiras, superfície externa de dípteros muscoides e amostras de água, buscando investigar os aspectos da disseminação relacionados à propagação de cepas clones e de elementos móveis veiculadores de resistência em diferentes esferas, assim como a interligação entre elas, sendo as moscas, nesse contexto, um personagem importante, dada a história natural desses dípteros associada à hábitos e comportamentos sinantrópicos e simbovinos (Olaru et al. 2023).

Além disso, pouco se sabe sobre a dinâmica entre as variações de clima referentes à sazonalidade e à disseminação da resistência a antimicrobianos, o que também afeta o ciclo de vida das moscas, uma vez que a temperatura e umidade interferem adiando ou estendendo os períodos de eclosão dos ovos e o estágio de pupa (Park et al. 2019).

A seguir serão discutidos os resultados apresentados nas quatro partes do trabalho.

5.1. Parte 1 – Resistência antimicrobiana em *E. coli* isoladas da microbiota intestinal de bovinos, caninos, equinos, ovinos e de amostras de água

De um modo geral os resultados mostraram baixa frequência de cepas multirresistentes (8,8% em bezerros e 24% em cães da Propriedade A; 14% bezerros e 10% vacas da Propriedade B) e de integrons (4,2% em bezerros da Propriedade A; 20% bezerros da Propriedade B), e devido a isso não foi possível determinar a relação entre presença/ausência de integron com a multirresistência a antimicrobianos.

A fim de excluir o efeito da temperatura e umidade na frequência populacional das moscas, foram coletados o mesmo número de moscas em ambos os períodos de inverno e verão (n=30). No entanto, os isolados de *E. coli* obtidos na coleta de inverno foram menores do que os obtidos no verão (35 e 69, respectivamente). O mesmo ocorreu entre os isolados coletados de amostras de água no inverno e no verão (11 e 20, respectivamente). Quanto aos bezerros, também houve uma taxa de isolamento menor no inverno do que no verão, porém em menor amplitude (102 no inverno e 142 no verão).

Esse resultado pode estar relacionado à disponibilidade de nutrientes e de resíduos ativos de antimicrobianos no ambiente devido às variações de temperatura, pH e luminosidade que podem afetar a taxa de crescimento dos microrganismos, o que pode favorecer ou não a manutenção e a disseminação da resistência antimicrobiana (Diwan et al. 2018; Keen et al. 2018; MacFadden et al. 2018).

As frequências de resistência a antimicrobianos entre os isolados de inverno e verão não apresentaram variações significativas ($p>0,05$), indicando que não há associação entre os períodos de coletas e a resistência exibida pelas cepas de *E. coli*. A frequência de multirresistência encontrada nos isolados da superfície externa das moscas foi elevada em ambos os períodos (65,71% no inverno e 43,48% no verão). A frequência de cepas multirresistentes isoladas de moscas coletadas em 2015 na Propriedade A no período do inverno foi 44,4% (Alves et al. 2018), uma frequência próxima à encontrada nos isolados de moscas no verão de 2019.

Alguns trabalhos têm relacionado o aumento da resistência antimicrobiana com o aumento da temperatura mínima (MacFadden et al. 2018), maior abundância de genes de resistência à tetraciclina durante os meses com maior pluviosidade (Keen et al. 2018) e diferenças nas frequências de resistência entre os antimicrobianos, de forma não homogênea, durante as estações amostradas (Diwan et al. 2018). No entanto, os resultados do presente estudo mostram uma tendência para as cepas isoladas no inverno em exibirem maior

frequência de resistência para os antimicrobianos: ampicilina, cefalexina, cefoperazona sódica, ciprofloxacina, enrofloxacina, cloranfenicol e sulfametoxazol/trimetoprim (Figura 5).

Os resultados confirmam a veiculação do integron de classe 1 contendo o cassete gênico *dfrA7* entre as cepas de bezerros e moscas da Propriedade A.

Conforme discutido por Labar et al. (2012), integrons de classe 1 contendo apenas uma cópia do cassete gênico *dfrA7*, não é comum, porém a incidência dessa particularidade em *E. coli* de diferentes origens indica a disseminação local ou regional do integron, similarmente ao proposto por Labar et al. (2012) ao investigarem a presença do gene em amostras de fezes de voluntários aparentemente saudáveis na Nigéria e encontraram uma cópia de *dfrA7* no integron de classe 1 detectado.

A capacidade de transferência por conjugação dos genes presentes nas cepas de *E. coli* positivas para integron também fornece subsídios à hipótese de disseminação do gene *dfrA7* no integron de classe 1 sob pressão seletiva de tetraciclina.

Na Propriedade B, os isolados dos bezerros apresentaram o gene *aadA1* inserido no integron de classe 1. Como no estudo realizado anteriormente por Alves (2017) não foram encontradas *E. coli* positivas para integron em isolados de moscas nessa propriedade, e, portanto, não foram realizadas novas coletas em 2019.

Em ambos os contextos, genes de resistência à tetraciclina parecem estar estruturalmente relacionados aos integrons pesquisados uma vez que os genes *tet* e os integrons podem estar localizados no mesmo elemento móvel (Agersø e Sandvang 2005) e foram transferidos por conjugação na presença de tetraciclina nos experimentos realizados.

Tetraciclina é amplamente administrada em animais de produção e a resistência em cepas bacterianas é bem documentada (Marshall e Levy 2011), no entanto, não há histórico de administração desse antimicrobiano nos animais do estudo, indicando que a manutenção e disseminação dos integrons podem estar relacionadas à poluição ambiental do antimicrobiano (Daghrir e Drogui 2013) ou ser resultante de cosseleção por meio do “efeito carona”, um mecanismo de evolução em que a frequência de um gene em determinada população deve-se a proximidade deste a outro gene, no mesmo *locus* ou elemento genético, que está sob influência da pressão seletiva (Hughes e Andersson 2017).

Os integrons são bons exemplos de “efeito carona” aplicado à resistência a antimicrobianos, uma vez que estruturalmente apresentam resistência a sulfonamida e a quaternário de amônio.

Em contrapartida, houve diferença entre os perfis plasmidiais encontrados entre os isolados de 2015 e 2019, porém os Inc/replicons FIB, P e K foram comuns.

De todas as cepas positivas para integron (Propriedade A, 2015 e 2019 e Propriedade B), a maioria foi alocada no grupo filogenético B1 (92,1%; 35/38), geralmente associado a *E. coli* comensais de origem animal (Lagerstrom e Hadly 2023).

Além disso, foi observado que eventos de conjugação podem apresentar elementos que participam da regulação da expressão gênica de ESBLs. Da mesma forma que o observado previamente em duas cepas transconjugantes de moscas (Alves 2017), a cepa transconjugante BA57d_t apresentou resultados positivos para a produção de ESBLs não verificados na cepa doadora e/ou receptora. Tais eventos podem estar relacionados à regulação da expressão de genes de resistência aos beta-lactâmicos de terceira geração nas cepas doadoras, uma vez que os genes poderiam estar sobre o efeito de repressores e/ou tiveram a expressão induzida com a ocorrência da conjugação.

A cepa transconjugante BA57d_t apresentou o gene *bla*_{CTX-M} que codifica para ESBL (Tabela 8) e, portanto, deve estar relacionado à expressão dos fenótipos observados na Figura 8. É conhecido que a presença de sequências de inserção (IS) adjacentes aos genes *bla*_{CTX-M} pode atuar como regulador e promover a superexpressão do gene (Cantón et al. 2012; Hussain et al. 2021). Essas IS geralmente fazem parte de transposons associados a integrons, que por sua vez podem estar integrados ao cromossomo bacteriano ou a plasmídeos (Cantón et al. 2012; Hussain et al. 2021).

Adicionalmente, tem sido discutido na literatura a função regulatória de plasmídeos, cuja aquisição por conjugação pode alterar a expressão de fenótipos nas bactérias ao modular a expressão de reguladores, presentes no cromossomo ou não (Billane et al. 2022). Um exemplo de regulação negativa, relacionada à aquisição de plasmídeos, é verificada para os genes *qacEΔ1* e *sul1* (Billane et al. 2022), curiosamente, genes estruturais de integrons de classe 1.

5.2. Parte 2 – Resistência à polimixina em *E. coli* isoladas da superfície externa de dípteros muscoides e da microbiota intestinal de animais coabitantes em propriedades leiteiras

Este estudo teve como objetivo rastrear a resistência à polimixina em cepas oriundas da microbiota intestinal de animais saudáveis sem histórico de utilização de polimixina e da superfície externa de moscas coabitantes com esses animais no contexto das propriedades leiteiras.

Os resultados mostram a alta frequência de *E. coli* resistente à polimixina B (32,7%; 287/877 da Propriedade A e de 8,4%; 74/877 da Propriedade B). No entanto, a resistência mediada por plasmídeo foi encontrada em apenas cinco cepas isoladas de bezerros da Propriedade B.

A taxa de resistência à polimixina ocasionada por mutações é considerada baixa para *E. coli*, geralmente de 0,2 a 0,6% (Sherry e Howden 2018), de modo que a frequência elevada encontrada no presente estudo, pode significar a ocorrência de algumas situações. Dado que não há histórico de utilização de polimixina nos animais amostrados, a alta frequência encontrada pode ser resultando da exposição ambiental à resíduos desse antimicrobiano ou a alteração do LPS da parede celular de *E. coli* decorrente de outros fatores.

Sobre a poluição ambiental por antimicrobianos, Samreen et al. (2021) dissertaram que o despejo de antimicrobianos não metabolizados ou dos seus resíduos por meio das fezes ou excretas dos animais é uma das principais fontes de disseminação da resistência antimicrobiana no ambiente, uma vez que a exposição a concentrações subterapêuticas pode promover a fixação de genes de resistência nas populações bacterianas.

Por outro lado, têm sido relatados casos de cepas resistentes à polimixina sem histórico de uso ou exposição do hospedeiro ao antimicrobiano (Olaitan et al. 2016). Analisando esses casos, sendo um deles reportados em cepas clínicas isoladas no Brasil, Olaitan et al. (2016), discutiram que a resistência à polimixina/colistina pode ter emergido independente do uso dos antimicrobianos, e ser devido à pressão exercida por antimicrobianos catiônicos como LL-37 e lisozima ou até mesmo como estratégia de resistência ao sistema imune, significando, portanto, resistência cruzada.

No Brasil, Oliveira et al. (2019) detectaram resistência à polimixina no solo e sugeriram que a propagação da resistência pode estar associada à cama de aves aplicada como fertilizante, uma vez que a polimixina tem sido utilizada na criação de aves e suínos,

principalmente. A região das fazendas estudadas é conhecida pela produção leiteira, mas também são encontradas granjas de aves e suínos na área (SEBRAE 2021). Com efeito, as práticas de fertilização com resíduos orgânicos de animais são típicas e estão entre as principais preocupações da disseminação da resistência antimicrobiana no meio ambiente ao atingir o solo, as plantas, as águas subterrâneas, os animais e os seres humanos (Samreen et al. 2021).

A administração terapêutica de polimixina é permitida no Brasil apesar da proibição do uso como promotor de crescimento desde 2016 (Mendes Oliveira et al. 2019), porém, o uso de polimixina em gado leiteiro é incomum (Huang et al. 2017). Desse modo, os dados apresentados indicam uma provável seleção de cepas resistentes à polimixina relacionadas à pressão ambiental.

O sequenciamento do genoma completo (WGS) de duas cepas resistentes à polimixina que não apresentaram genes *mcr* (BA57d e BB1d), revelou mutações nos genes *arnA*, *pmrC*, *pmrE*, *pmrF*, que promovem a modificação do lipídeo A com a adição de arabinose (Gatzeva-Topalova et al. 2005).

A exposição ambiental à polimixina também atua na mobilização de genes pela transferência horizontal. Até o momento, são conhecidos dez genes *mcr* (*mcr-1* a *mcr-10*) (Sherry e Howden 2018), mas no Brasil apenas *mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-7* e *mcr-9* foram detectados até a presente data (Costa-Júnior et al. 2023).

As cinco cepas positivas para *mcr-1.1* apresentaram similaridade genômica de aproximadamente 80% e foram, portanto, consideradas estreitamente relacionadas (Figura 10) (Tenover et al. 1995). A cepa multirresistente portadora de *mcr-1.1* (BB6d) (Tabela 10) foi selecionada para o sequenciamento do genoma completo para a investigação do ambiente genético do gene e tipagem mais completa da cepa.

Houve divergência entre os resultados obtidos com as metodologias baseadas em PCR e os obtidos com a busca genômica para o grupo filogenético e plasmidiais (Inc/replicons). A cepa BB6d foi identificada como pertencente ao filogruppo A pelos dados gerados com WGS e os plasmídeos detectados foram IncFIB(AP001918), IncFIC(FII) e IncX4, revelando que as técnicas de tipagem por PCR utilizadas são limitadas e passíveis de erro.

O gene *mcr-1.1* foi identificado adjacente aos genes *pir*, *parA* e à IS26 no plasmídeo IncX4 que apresenta genes de mobilização e conjugação (Figura 11). A busca na ferramenta BLAST mostrou que o plasmídeo apresentou similaridade com outros plasmídeos, dos quais foram selecionados CP015977.1 e MF175184.1 (GenBank) a fim de comparação.

Os plasmídeos IncX são conhecidos pelo papel na disseminação de vários genes de resistência, sendo os IncX4 um dos principais plasmídeos associados à mobilização dos genes *mcr-1* no mundo todo, apresentando altas taxas de transferência e frequentemente encontrados em *E. coli* e outras bactérias isoladas de diferentes fontes animais (Sun et al. 2017). No Brasil, os plasmídeos IncX4 têm apresentado pouca variabilidade e têm sido relacionados à disseminação de *mcr-1* identificados em diferentes fontes e contextos (hospitalar, ambiental, animal) e, portanto, considerados endêmicos (Zamparette et al. 2020).

O plasmídeo encontrado na cepa BB6d apresenta alta similaridade com os plasmídeos IncX4, CP015977.1 identificado em *E. coli* isolada de infecção humana no Brasil (Fernandes et al. 2016a), e ao plasmídeo MF175184.1 identificado em isolados de *E. coli* em carne de peru na Suíça (Zurfluh et al. 2017). Isso apoia o discutido por Fernandes et al. (2016a) ao classificar os plasmídeos IncX4 como promíscuos devido sua ampla distribuição entre os continentes e fontes de isolamento.

Conforme (Du et al. 2020), o plasmídeo IncX4 de BB6d apresenta estrutura típica desse grupo e a região do *mcr* composta por *hns-IS26-parA-mcr.1.1-pir*, idêntica a outros já relatados. As sequências de inserção IS26 são conhecidas pelo papel que desempenham na disseminação de genes de resistência a antimicrobianos e a integrons em bactérias Gram-negativas (Harmer et al. 2014).

Adicionalmente, foi encontrado um integron de classe 1 não usual portador de *sul3* e *qacL*. O *contig* contendo o integron foi reunido pelo algoritmo do plasmidSPAdes e apresentou conformação circular (Figura 12), o que deve ter sido ocasionado por um tipo de transposição replicativa realizada pela IS26 (He et al. 2015). Estavam presentes os cassetes gênicos *aac(6')-Ib7*, *aadA2*, *cmlA1*, *aadA1*, com o gene *mefB* associado. Integron de classe 1 geralmente apresentam *sul1* e *qacEΔ1* em sua estrutura, porém alguns trabalhos têm reportado integron de classe 1 com *sul3* e *qacL* (Chen et al. 2021; Hammad et al. 2022; Srednik et al. 2023), todos relacionados à disseminação de resistência a aminoglicosídeos e cloranfenicol em cepas portadoras do gene *mcr*.

Em seu trabalho, Batisti Biffignandi et al. (2022) isolaram do fígado de um gato uma cepa de *E. coli* multirresistente do filogruppo A, ST167 e O101:H9, igualmente a cepa BB6d, porém o perfil dos fatores de virulência encontrado nas duas cepas foi distinto. A ST167 é reconhecida como clone de potencial elevado de disseminação, uma vez que tem sido isolado de diversos contextos (hospitalar, ambiental, animais domésticos e selvagens) (Batisti Biffignandi et al. 2022)

O filogrupo A é tradicionalmente associado às cepas comensais de humanos (Russo e Johnson 2000). No entanto a cepa *mcr* positiva analisada apresentou a maioria dos fatores de virulência relacionados às *E. coli* extraintestinais (ExPEC: APEC (patogênica para aves), NMEC (meningite neonatal, UPEC (uropatogênica)), nomeadamente: *papA_F11*, *papC*, *fdeC*, *hra* (adesinas); *traT* (proteína de transferência); *csgA* (curli/biofilme); *iss* (aumento de sobrevivência sérica); *hlyE* (hemolisina); *terC* (proteína de resistência a telurito); *aslA* (invasina (Hoffman et al. 2000; Nesta et al. 2012; Sarowska et al. 2019; Malberg Tetzschner et al. 2020; Sora et al. 2021). E o gene *capU* (hexosiltransferase) de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Tanih et al. 2019).

Portanto, BB6d é uma cepa multirresistente, portadora de *mcr-1.1* e integron de classe 1, apresenta clone ST167 disseminado mundialmente e potencial patogênico relacionado principalmente às infecções extraintestinais ocasionadas por *E. coli*.

5.3. Parte 3 – Detecção e caracterização das cepas de *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) isoladas da superfície externa de dípteros muscoides e da microbiota intestinal de animais coabitantes em propriedades leiteiras

Apesar da discussão atual sobre EHEC e STEC, para efeito da discussão dos resultados, as cepas portadoras do gene *stx* e do gene *eae*, simultaneamente, foram consideradas EHEC, uma vez que apresentam potencial para a produção das lesões A/E. As cepas portadoras apenas do gene *stx1* ou *stx2* foram denominadas STEC, independente da produção do efeito citotóxico em células Vero. Entre as STECs isoladas das Propriedades A e B foram encontradas altas frequências de EHEC (59,14% e 73,33%, respectivamente).

A frequência de STEC isoladas de bezerros na Propriedade A em 2015 foi de 32,75%, uma taxa elevada considerando que a prevalência de STECs oriundas de bezerros no Brasil abrange 12% a 20,9% (Castro et al. 2019). No entanto, a frequência de STEC diminuiu significativamente nos isolados de 2019, apresentando 4,9% no inverno e 7,04% no verão.

A alimentação é um dos fatores que podem estar envolvidos na incidência de STEC na microbiota de bovinos (Vasco et al. 2021), porém não houve registro de mudanças de manejo e composição da alimentação entre 2015 e 2019 (sistema de semiconfinamento com suplementação alimentar com ração e feno) (Alves 2017).

A maioria das cepas selecionadas para sorotipagem foi alocada no filogruppo B1. De fato, os bovinos são o principal reservatório natural de STEC, predominantemente do filogruppo B1 (Arimizu et al. 2019). Quanto à multirresistência, foram observadas seis amostras, sendo uma produtora de ESBL.

Uma amostra B1 (BA19e) foi sorotipada como O26:H11, sorotipo classificado como o mais importante sorotipo não-O157:H7 (Bielaszewska et al. 2007). A cepa apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados e foi positiva para os genes *stx1*, *eae*, *saa* e *ehxA*. O sorotipo O26:H11 tem sido o mais frequente entre as STEC não-O157:H7 e no Brasil era o segundo mais frequente entre os anos de 1970 e 2013 (Piazza et al. 2013; Rodwell et al. 2023).

Além do sorogruppo O26, outros cinco sorogruppos de STEC também são relacionados às doenças severas e juntos são conhecidos como *big six* (O26, O45, O103, O111, O121 e O145) (Bertoldi et al. 2018). Outras STECs pertencentes ao *big six* foram BA19c, BA26b (O26) e BA30e, BA36a (O103), todas EHEC e pertencentes ao filogruppo B1, exceto BA30e negativa para o gene *eae* e pertencente ao clado I/II (Tabela 11).

Em contraste com as STEC O26, alguns estudos apontam o sorogrupo O103 como o mais comum associado às doenças em humanos e frequentemente envolvido em surtos provocados pelo consumo de alimentos contaminados (Zhang et al. 2021). No Brasil, tanto O26 quanto O103 estiveram relacionados às doenças transmitidas por alimentos em diferentes regiões do país (Castro et al. 2019).

O isolamento de STEC da superfície externa de moscas indica que esses dípteros podem atuar como vetores mecânicos dessas *E. coli*, ilustrando uma via intermediária de disseminação entre o fecal-oral e entre o contato direto com animais, apesar de STEC de moscas e de bezerros não terem apresentado elevada similaridade genômica pela técnica de PFGE (Figura 15).

Além da transmissão de bactérias por meio do pouso, as moscas podem dispensá-las pela regurgitação e excretas. Alguns trabalhos identificaram a proliferação de *E. coli* O157:H7 no sistema digestório das moscas, indicando uma transmissão biologicamente aprimorada (*bio-enhanced*) (Puri-Giri et al. 2017).

Puri-Giri et al. (2017) discutem que a prevalência de STEC é menor ou inexistente no inverno quando comparada a do verão, e obtiveram a frequência de 1,5% em *E. coli* isoladas de moscas simbovinas. No Brasil foi relatada a frequência de 13,6% e de 5,18% de STEC em isolados de moscas coletadas em propriedades leiteiras (de Castro et al. 2013; Alves et al. 2018). No presente estudo foi encontrada a frequência de 20,29% de STEC em moscas coletadas no verão de 2019.

As STECs multirresistentes aos antimicrobianos apresentaram diversidade genômica (Figura 15), sendo que apenas duas cepas isoladas de bezerros no verão foram consideradas estreitamente relacionadas (BV10e, BV11e com 85% de similaridade genômica). A ausência de clones entre as STECs pela técnica de PFGE, indica que os genes *stx* podem estar disseminados entre cepas de *E. coli* com diferentes perfis genéticos.

Apesar disso, a presença de STEC no ambiente de ordenha implica risco de contaminação do leite, dos trabalhadores e dos moradores das propriedades. Adicionalmente, a disseminação de STEC pode ser ampliada devido à veiculação por moscas que circulam entre os ambientes contaminados como as fezes dos bovinos e os não contaminados como os alimentos.

5.4. Parte 4 – Perfil de *E. coli* isoladas de dípteros muscoides e animais coabitantes em propriedades leiteiras e a permanência da resistência a antimicrobianos no ambiente

Diante dos resultados obtidos com cepas isoladas da superfície externa das moscas (Alves 2017), era esperado que os perfis e as frequências de resistência antimicrobiana fossem reproduzidos principalmente nos isolados dos bezerros devido ao maior contato das moscas com as fezes desses animais. O teste de Kruskal-Wallis não mostrou variação significativa entre as frequências de resistência entre os grupos das moscas e dos bezerros e entre moscas e cães da Propriedade A (Figura 17). Na Propriedade B não houve variação entre moscas e bezerros, vacas, carneiro e cordeiros (Figura 19).

A semelhança nas frequências de resistência entre os grupos citados pode indicar o fluxo e a circulação dos mesmos determinantes de resistência antimicrobiana e/ou a propagação das mesmas linhagens resistentes entre diferentes hospedeiros animais.

As moscas presentes nos ambientes de fazenda têm sido apontadas como vetores mecânicos e biológicos de bactérias multirresistentes, e especula-se que tais bactérias podem ser transferidas à prole (transferência vertical), persistindo na geração seguinte e, portanto, atuando também como reservatório de bactérias resistentes a antimicrobianos (Fukuda et al. 2019).

Nesse sentido foram verificadas semelhanças nos perfis de resistência fenotípica entre *E. coli* isoladas de moscas e fezes de bezerros em 2015 e no verão de 2019 (BA57c e MA17; MV4 e BV22) (Figura 20). No entanto, a análise de similaridade genômica por meio do perfil de macrorrestrição enzimática realizada pela técnica de PFGE, mostrou agrupamento clonal independentes entre cepas isoladas de bezerros e de moscas apresentando perfis de resistência e plasmidiais semelhantes e distintos (Figura 21).

Do mesmo modo, é possível observar que as cepas isoladas em 2015 e em 2019 apresentaram uma tendência de agrupamento de acordo com a origem de isolamento e o período de coleta, apesar da diversidade genômica encontrada (Figura 22). Uma exceção ocorreu para as cepas MI5b (mosca inverno) e BV22a (bezerro verão) que apresentaram similaridade genômica relativamente alta.

Diante desses resultados, infere-se que não é possível traçar um paralelo entre os perfis de resistência e a similaridade genômica das cepas. No entanto, todas as cepas analisadas pelo método de PFGE eram positivas para integron de classe 1, o marcador molecular eleito neste trabalho, o que sugere a disseminação desses elementos genéticos

associados à resistência antimicrobiana independente da circulação de clones no interior das propriedades leiteiras e entre os animais.

Nessa perspectiva, o pulsotipo 7 (Figura 22) constituído por clones isolados de diferentes bezerros da Propriedade A, apresentou cepas STEC e não STEC. Adicionalmente, nenhuma cepa integron positiva isolada de moscas foi identificada como STEC.

A análise filogenética baseada no genoma central de 12 cepas de *E. coli* (Figura 30) mostrou dois clados compostos por cepas clones com mesmo perfil de fatores de virulência, mas com determinantes de resistência distintos. Um clado formado por cepas provenientes de moscas e fezes de cão (ST58) e o outro formado por cepas de moscas e fezes de bezerros (ST224), ambos da Propriedade A (Tabela 14 e Tabela 15). Além desses, os clones do mesmo bezerro BA57c e BA 57d (ST224) também apresentaram mesmos fatores de virulência e diferentes genes de resistência a antimicrobianos.

A existência de fatores de virulência do grupo F17 na cepa de mosca MA17a, uma fímbria relacionada à patogenicidade em bovinos, clone da cepa de bezerro BA15d, pode indicar a contaminação do exoesqueleto da mosca com as fezes do bezerro, sugerindo, portanto, o bovino como fonte de contaminação.

Em 2013, Usui et al. (2013) pesquisando a disseminação de genes de ESBL no contexto das fazendas, identificaram o mesmo clone portador de *bla*_{CTX-M-15} em moscas e fezes de bezerros. Até o presente momento não há registros de propagação de clones entre moscas e cães.

Em contrapartida, as duas cepas STEC isoladas das fezes de bezerros da Propriedade B foram identificadas como clones (ST21) e apresentaram mesmos perfis de virulência e de resistência.

Os resultados obtidos para as cepas da Propriedade A podem significar a existência de dinâmicas de disseminação diferentes entre determinantes genéticos de resistência e fatores de virulência. De modo que os fatores de virulência parecem estar mais associados à propagação de linhagens e genes de resistência à disseminação por elementos móveis.

A esse respeito, Beceiro et al. (2013) elaboraram um extenso trabalho associando os mecanismos evolutivos entre os fatores de virulência bacterianos e a aquisição de resistência a antimicrobianos. Eles verificaram que não há um padrão, uma vez que alguns contextos favorecem a coevolução entre virulência e resistência enquanto em outros a seleção de um culmina na redução do outro, sendo, portanto, essas interações dependentes de múltiplos fatores. Porém, a seleção de fatores de virulência por estar relacionada ao ganho de

aptidão a diferentes nichos e/ou hospedeiros pode parecer mais lenta comparada a seleção de resistência a antimicrobianos, cuja mudança pode ser relativamente rápida a depender da pressão ambiental exercida pela disponibilização de agentes antimicrobianos.

A técnica de PFGE e a filogenia molecular realizada a partir dos dados do genoma completo não identificaram os mesmos clones. A tipagem de cepas utilizando PFGE consiste em uma abordagem mais geral, uma vez que é baseada no perfil de bandas geradas a partir da restrição enzimática do DNA bacteriano. Essa técnica tem sido amplamente usada na investigação epidemiológica de fontes de disseminação em contextos de surtos, principalmente locais. No entanto, com a recente popularização de técnicas de sequenciamento completo e de bioinformática, análises filogenéticas mais amplas têm ganhado espaço e oferecido maior sensibilidade na discriminação de clones do que a técnica de PFGE (Neoh et al. 2019).

A tipagem de sequências multilocus (MLST) em sequências tipo (ST) fornece a caracterização de cepas em um contexto mais amplo, de forma que é possível identificar e comparar clones mundialmente difundidos quanto à epidemiologia, patogenicidade, evolução e disseminação de resistência a antimicrobianos (Wang et al. 2021).

Na Propriedade A foram encontradas as sequências tipo ST224 (MA17a, BA15d, BA57c e BA57d), ST58 (MA17b, MA26a, MA26b e CAO4d) e ST332 (BA37e). Na Propriedade B ST21 (BB1d e BB8c) e ST167 (BB6d, discutida na parte 2).

Os clones ST224 e ST58 são considerados de alto risco pandêmico, apresentam disseminação mundial e têm sido reportados em *E. coli* isoladas de humanos, animais (produção, companhia e selvagens) e ambiente, sendo ST224 também associado à disseminação dos genes *bla*_{CTX-M} (Fuentes-Castillo et al. 2021; Fuga et al. 2022; Benlabidi et al. 2023; Sano et al. 2023). Além disso, ST224 e ST58 têm sido associados ao patotipo ExPEC (Benlabidi et al. 2023).

No Brasil, há registros de *E. coli* ST224 causando infecções em humanos e em amostras de suínos, gato doméstico, peixes de rio e pombos (Fuga et al. 2022; Sano et al. 2023), e de ST58 em humanos, aves, animais selvagens de convívio urbano próximo e mangue poluído (Fuentes-Castillo et al. 2021).

No presente estudo, ST224 foi identificado em amostras da superfície externa de moscas (*Musca domestica*) e de fezes de bezerros, e todas as cepas ST224 portadoras de integron apresentaram o gene *bla*_{CTX-M-2}. Nesse contexto, Hickman et al. (2022) identificaram *E. coli* de mesmo ST entre amostras de bezerros e moscas em propriedades leiteiras na Suíça. Já ST58 foi aqui identificado em isolados de moscas (*Musca domestica* e *Fannia* sp.) e cão.

Escherichia coli ST21 O118/O151:H16 foi identificada nas STECs integron positivas de bezerros da Propriedade B. Alguns trabalhos recentes têm relatado a presença dessa linhagem em STECs não-O157 e não *big six* em amostras de pacientes humanos com sintomas gastrointestinais nos Estados Unidos e Inglaterra (Abdalhamid et al. 2020; Dallman et al. 2021; Rodwell et al. 2023).

Os integrons de classe 1 presentes nas cepas da Propriedade A não foram identificados em plasmídeos e apresentaram a seguinte estrutura: *intI1-dfrA7-qacEΔ1-sul1-bla_{CTX-M-2}-qacEΔ1-sul1-tniB-tniA*. A presença de duas cópias de *qacEΔ1* e *sul1* no mesmo elemento, identifica um integron de classe 1 complexo, definido como a associação de diferentes integrons de classe 1 por meio de uma transposase (ISCR1, família IS91) (Mazel 2006; Cheng et al. 2016). Na Figura 26 que ilustra a sequência do integron encontrado nas cepas da Propriedade A, é possível notar que a região correspondente à ISCR1 foi identificada pelas ferramentas de anotação do genoma como uma proteína hipotética (*hypothetical protein*) e que o gene agregado ao integron principal corresponde ao *bla_{CTX-M-2}*.

É documentada a participação do elemento ISCR1 na disseminação de genes *bla_{CTX-M}* e a associação com integrons de classe 1 é conhecida e frequente apesar dos mecanismos genéticos envolvidos ainda não serem totalmente compreendidos (Zhao e Hu 2013). No Brasil, essa estrutura de integron de classe 1 complexo foi reportado por Dropa et al. (2015) em amostras clínicas em sete espécies de Enterobacteriaceae, incluindo *E. coli*, o que demonstra a disseminação do integron em cepas oriundas de diferentes contextos (hospitalar, animal e ambiental), independente da circulação de clones.

Provavelmente a sequência maior de 45 kpb (Figura 26) contendo o gene *tetA* estava integrado a algum elemento conjugativo, uma vez que os ensaios de conjugação foram realizados sob a pressão seletiva de tetraciclina. No entanto, a transposase TnAs1 adjacente à *tetA* e a presença de IS6 (ISR1e7) indicam que partes dessa sequência podem ter sido mobilizadas nas outras cepas que apresentaram apenas a sequência menor constituída pelo integron complexo.

Curiosamente a comparação da sequência de 45 kpb com o plasmídeo CP031284.1, identificado em *Escherichia fergusonii* isoladas de aves no Brasil (Galetti et al. 2019), demonstrou a fragmentação na altura do gene *smc* (Figura 26 e Figura 27), indicando que a mobilização e disseminação dessa sequência pode ser realizada por dois fragmentos separados, provavelmente devido à presença das transposases mencionadas.

Já os integrons identificados nas cepas da Propriedade B apresentaram estrutura simples *intI1-aadA1-qacEΔ1-sul1*, com apenas um cassete gênico inserido na região variável,

flanqueado pelas transposases TnAs3 e IS1326 (Figura 28) e integrado a um plasmídeo p0111 (Figura 29). O plasmídeo apresentou similaridade com os plasmídeos AP010962.1 e o AP027192.1, ambos presentes em STECs isoladas de pacientes com diarreia no Japão (Ogura et al. 2009; Yano et al. 2023).

O plasmídeo p0111 corresponde na verdade a um plasmídeo ligado ao fago (*phage-like plasmid*), uma vez que apresenta sequência muito similar ao fago P1, um bacteriófago temperado que pode ser encontrado como profago na célula bacteriana hospedeira na forma de um plasmídeo autônomo (Łobocka et al. 2004; Ogura et al. 2009).

Na Figura 29 é possível observar claramente a região correspondente ao integron de classe 1 integrado à sequência do fago P1 (plasmídeo p0111). A disseminação de integrons por meio de fagos-plasmídeos foi descrita recentemente (Pfeifer et al. 2022) e alerta para novas rotas e mecanismos de disseminação de genes de resistência a antimicrobianos (Qi et al. 2023). Além disso, outros trabalhos já têm associado p0111 à disseminação de resistência não veiculada a integrons como a resistência à ciprofloxacina e cefotaxima (Allen et al. 2017).

Apesar da resistência a antimicrobianos em cepas bacterianas ser um tema mundialmente difundido e amplamente estudado, ainda são poucos os trabalhos direcionados aos mecanismos envolvidos na resistência de cepas de origem animal e de moscas, às práticas veterinárias e às pressões ambientais envolvidas na seleção dos microrganismos resistentes.

Os resultados obtidos fornecem subsídios robustos para a futura compreensão dos mecanismos moleculares ligados à disseminação, ecologia e regulação dos elementos genéticos envolvidos na resistência antimicrobiana, e a participação das STEC nesse contexto.

Todas as cepas utilizadas nesta pesquisa foram isoladas de animais saudáveis, o que contribui para a análise mais ampla da disseminação da resistência. Além disso, a investigação da participação das moscas na disseminação da resistência e na propagação de cepas no ambiente adiciona e ilustra uma rota ainda pouco discutida e a não inclusão destas nas rotas de disseminação reflete a dificuldade em estabelecer o sentido da contaminação (moscas-ambiente ou ambiente-moscas) (Onwugamba et al. 2018) e consequentemente a adoção de práticas preventivas.

Outro fator ainda pouco explorado na disseminação da resistência antimicrobiana no ambiente diz respeito às interferências das variações climáticas no processo, principalmente as alterações de temperatura. Apesar da temática das mudanças climáticas ser atual, dados experimentais sobre a relação entre o clima e a disseminação da resistência são escassos (MacFadden et al. 2018).

Ainda temos poucos dados no Brasil relacionados à disseminação de resistência antimicrobiana por meio da veiculação por moscas, e o primeiro relato foi realizado em 2018, abordando restritamente os resultados referentes às *E. coli* isoladas da superfície externa de moscas coletadas nas Propriedades A e B (Alves et al. 2018). Posteriormente, Carramaschi e colaboradores realizaram trabalhos a partir da captura de moscas no ambiente urbano próximo a hospitais do Rio de Janeiro (Carramaschi et al. 2021b, 2021a).

Em uma investigação sobre os constituintes da microbiota de *Musca domestica* e a influência do ambiente de coleta e região geográfica, Park et al. (2019), discutiram a influência do hábitat na composição da microbiota das moscas. Estudos apontam que principalmente a microbiota externa associada ao exoesqueleto, tende a ser semelhante às comunidades bacterianas encontradas em excrementos de animais de criação (Solà-Ginés et al. 2015; Park et al. 2019).

Diante dos resultados apresentados e do que têm sido relatado sobre a temática da disseminação da resistência antimicrobiana, as moscas têm emergido como um elemento chave para o controle e monitoramento da disseminação da resistência antimicrobiana e da propagação de patógenos. Dada a atuação das moscas como vetores mecânicos e biológicos de bactérias, sua facilidade em transitar entre ambientes (contaminados e não contaminados, humanos, animal, hospitalar), e métodos de captura relativamente simples, Yin et al. (2022) sugeriram que as moscas podem ser utilizadas como ferramentas de vigilância de resistência antimicrobiana.

VI – Conclusões

Diante dos resultados obtidos, das metodologias empregadas e do contexto do estudo, foi observado que a disseminação de genes de resistência não depende da disseminação de cepas e manutenção de clones no ambiente. As semelhanças genômicas não estão relacionadas aos determinantes de resistência a antimicrobianos ou aos fatores de virulência.

A circulação de clones entre mosca e bezerro e entre mosca e cão, assim como as semelhanças nas frequências de resistência aos antimicrobianos entre os isolados de moscas e dos outros animais, indicam efetivamente uma rota de disseminação envolvendo as moscas no contexto das propriedades leiteiras. De modo que o controle de criadouros de moscas pode constituir uma ferramenta de controle de disseminação de bactérias patogênicas e resistentes aos antimicrobianos.

VII - Referências Bibliográficas

- Abdalhamid B, Mccutchen EL, Iwen PC, Gomes-Neto JC, Benson AK, Hinrichs SH. Genome sequences of uncommon Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes. Rasko D, organizador. Microbiol Resour Announc [Internet]. 5 de março de 2020;9(10). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MRA.01496-19>
- Agersø Y, Sandvang D. Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil. Appl Environ Microbiol [Internet]. dezembro de 2005;71(12):7941–7. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.71.12.7941-7947.2005>
- Allel K, Day L, Hamilton A, Lin L, Furuya-Kanamori L, Moore CE, et al. Global antimicrobial-resistance drivers: an ecological country-level study at the human–animal interface. Lancet Planet Health [Internet]. abril de 2023;7(4):e291–303. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2542519623000268>
- Allen RC, Pfrunder-Cardozo KR, Meinel D, Egli A, Hall AR. Associations among antibiotic and phage resistance phenotypes in natural and clinical *Escherichia coli* isolates. Wright GD, organizador. mBio [Internet]. 8 de novembro de 2017;8(5). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01341-17>
- Alterthum F. Microbiologia. 6º ed. São Paulo: Atheneu; 2015.
- Alves T dos S. Epidemiologia molecular da resistência a antimicrobianos e fatores de virulência em *Escherichia coli* isoladas de dípteros muscoides em propriedade leiteira [Internet] [Dissertação]. Universidade Estadual de Campinas; 2017. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/325621>
- Alves T dos S, Lara GHB, Maluta RP, Ribeiro MG, Leite D da S. Carrier flies of multidrug-resistant *Escherichia coli* as potential dissemination agent in dairy farm environment. Sci Total Environ [Internet]. agosto de 2018;633:1345–51. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718310647>
- Andrews S. FastQC—A quality control tool for high throughput sequence data [Internet]. Babraham Bioinformatics. 2010. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Antipov D, Hartwick N, Shen M, Raiko M, Lapidus A, Pevzner PA. plasmidSPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data. Bioinformatics [Internet]. 15 de novembro de 2016;32(22):3380–7. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/32/22/3380/2525610>
- Argudín M, Deplano A, Meghraoui A, Dodémont M, Heinrichs A, Denis O, et al. Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. Antibiotics [Internet]. 6 de junho de 2017;6(2):12. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2079-6382/6/2/12>
- Arimizu Y, Kirino Y, Sato MP, Uno K, Sato T, Gotoh Y, et al. Large-scale genome analysis of bovine commensal *Escherichia coli* reveals that bovine-adapted *E. coli* lineages are

- serving as evolutionary sources of the emergence of human intestinal pathogenic strains. *Genome Res* [Internet]. setembro de 2019;29(9):1495–505. Disponível em: <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.249268.119>
- Ayres M, Ayres Junior M, Ayres D, Santos AAS. *BioEstat 5.3: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas*. Belém, Pará: Sociedade Civil Mamirauá; 2007. p. 324p.
- Babakhani S, Oloomi M. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J Basic Microbiol* [Internet]. novembro de 2018;58(11):905–17. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jobm.201800204>
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* (1979) [Internet]. 25 de março de 2005;307(5717):1915–20. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1104816>
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* [Internet]. maio de 2012;19(5):455–77. Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/cmb.2012.0021>
- Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol*. 2008;19(3):260–5.
- Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Stallwood AD, Davies RH, Liebana E. *bla*_{CTX-M} genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(4):1319–22.
- Batisti Biffignandi G, Piazza A, Marchesini F, Prati P, Mercato A, Abu Alshaar A, et al. Genomic characterization of an O101:H9-ST167 NDM-5-producing *Escherichia coli* strain from a kitten in Italy. Bekal S, organizador. *Microbiol Spectr* [Internet]. 29 de junho de 2022;10(3). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.00832-22>
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* [Internet]. abril de 1966;45(4):493–6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5325707>
- Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev* [Internet]. abril de 2013;26(2):185–230. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00059-12>
- Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microb Genom* [Internet]. 1º de julho de 2018;4(7). Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000192>

- Benlabidi S, Raddaoui A, Lengliz S, Cheriet S, Hynds P, Achour W, et al. Occurrence of high-risk clonal lineages ST58, ST69, ST224, and ST410 among extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy free-range chickens (*Gallus gallus domesticus*) in a rural region in Tunisia. *Genes (Basel)* [Internet]. 6 de abril de 2023;14(4):875. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4425/14/4/875>
- Berg HC. Why *E. coli*? Em: *E. coli* in motion [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2004. p. 1–6. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-21638-6_1
- Berglund B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infect Ecol Epidemiol* [Internet]. 2015;5(1):28564. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/iee.v5.28564>
- Bertoldi B, Richardson S, Goodrich Schneider R, Kurdmongkolthan P, Schneider KR. Preventing foodborne illness: *E. coli* “The Big Six”. *EDIS* [Internet]. 12 de janeiro de 2018;2018(1). Disponível em: <https://journals.flvc.org/edis/article/view/105214>
- Bertolini AB, Prado AM, Thyssen PJ, de Souza Ribeiro Mioni M, de Gouvea FLR, da Silva Leite D, et al. Prevalence of bovine mastitis-related pathogens, identified by mass spectrometry in flies (Insecta, Diptera) captured in the milking environment. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 1º de novembro de 2022;75(5):1232–45. Disponível em: <https://academic.oup.com/lambio/article/75/5/1232/6989445>
- Bielaszewska M, Zhang W, Mellmann A, Karch H. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: a human pathogen in emergence. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* [Internet]. 2007;120(7–8):279–87. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17715820>
- Billane K, Harrison E, Cameron D, Brockhurst MA. Why do plasmids manipulate the expression of bacterial phenotypes? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [Internet]. 17 de janeiro de 2022;377(1842). Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2020.0461>
- Blanco JE, Blanco M. *Escherichia coli* enterotoxigenicos, necrotoxigenicos y verotoxigenicos de origen humano e bovino—pathogenesis epidemiologia y diagnostico microbiologico. Lugo, Espanha: Servicio de Publicaciones Diputacion Provincial San Marcos; 1993.
- Blount ZD. The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife* [Internet]. 25 de março de 2015;4. Disponível em: <https://elifesciences.org/articles/05826>
- van den Bogaard, A; Stobberingh E. Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. maio de 2000;14(4):327–35. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092485790000145X>

- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* [Internet]. 1º de agosto de 2014;30(15):2114–20. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/15/2114/2390096>
- Bradford PA. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. outubro de 2001;14(4):933–51. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
- Brown-Jaque M, Calero-Cáceres W, Muniesa M. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid* [Internet]. maio de 2015;79:1–7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147619X15000116>
- Bush K, Bradford PA. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 5 de maio de 2019;17(5):295–306. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-019-0159-8>
- Cadavid-Sanchez IC, Amat E, Gomez-Piñerez LM. Enterobacterias aisladas de moscas sinantrópicas (Diptera, Calyptratae) en Medellín, Colombia. *Caldasia*. 2015;37(2):319–32.
- Cantas L, Shah SQA, Cavaco LM, Manaia CM, Walsh F, Popowska M, et al. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front Microbiol*. 2013;4.
- Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol* [Internet]. 2012;3. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00110/abstract>
- Cao V, Lambert T, Nhu DQ, Loan HK, Hoang NK, Arlet G, et al. Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. dezembro de 2002;46(12):3739–43. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.46.12.3739-3743.2002>
- Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(6):2227–38.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* [Internet]. dezembro de 2005;63(3):219–28. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701205001132>
- Carramaschi IN, Lopes JCO, Leite JA, Carneiro MT, Barbosa RR, Boas MHV, et al. Surveillance of antimicrobial resistant bacteria in flies (Diptera) in Rio de Janeiro city. *Acta Trop* [Internet]. agosto de 2021a;220:105962. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X21001418>

- Carramaschi IN, dos S. B. Ferreira V, Chagas TPG, Corrêa LL, Picão RC, de C. Queiroz MM, et al. Multidrug-resistant *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* carrying *bla*_{NDM}-*bla*_{CTX-M15} isolated from flies in Rio de Janeiro, Brazil. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. março de 2021b;24:1–5. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213716520303076>
- Casseri E, Bulut E, Llanos Soto S, Wemette M, Stout A, Greiner Safi A, et al. Understanding antibiotic resistance as a perceived threat towards dairy cattle through beliefs and practices: a survey-based study of dairy farmers. *Antibiotics* [Internet]. 25 de julho de 2022;11(8):997. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/8/997>
- Castro BG de, Souza MMS de, Bittencourt AJ. Aerobic bacterial microbiota in *Stomoxys calcitrans*: preliminary studies in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* [Internet]. dezembro de 2007;16(4):193–7. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612007000400003&lng=en&tlng=en
- Castro BG de, Souza MMS de, Bittencourt AJ. Isolamento de espécies enterobacterianas em *Stomoxys calcitrans*. *Ciência Rural* [Internet]. dezembro de 2008a;38(9):2654–7. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000900043&lng=pt&nrm=iso&tlng=en
- de Castro BG, de Souza MMS, Regua-Mangia AH, Bittencourt AJ. Occurrence of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* in *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* [Internet]. junho de 2013;22(2):318–21. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612013000200318&lng=en&tlng=en
- Castro BG, Souza MMS, Bittencourt AJ. Microbiota bacteriana em segmentos de mosca do estábulo *Stomoxys calcitrans* no Brasil: primeiro relato de espécies. *Arq Bras Med Vet Zootec* [Internet]. agosto de 2008b;60(4):1029–31. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352008000400039&lng=pt&tlng=pt
- Castro VS, Figueiredo EE de S, Stanford K, McAllister T, Conte-Junior CA. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in Brazil: a systematic review. *Microorganisms* [Internet]. 16 de maio de 2019;7(5):137. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/5/137>
- Chapman PA, Ellin M, Ashton R, Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *Int J Food Microbiol* [Internet]. agosto de 2001;68(1–2):11–20. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501004640>
- Chen FJ, Lauderdale TL, Huang WC, Shiau YR, Wang HY, Kuo SC. Emergence of *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-8* in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan. *Clin Microbiol*

- Infect [Internet]. fevereiro de 2021;27(2):305–7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X20304705>
- Cheng C, Sun J, Zheng F, Lu W, Yang Q, Rui Y. New structures simultaneously harboring class 1 integron and ISCR1-linked resistance genes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria. BMC Microbiol [Internet]. 21 de dezembro de 2016;16(1):71. Disponível em: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-016-0683-x>
- Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. junho de 2001;65(2):232–60. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ Microbiol Rep [Internet]. fevereiro de 2013;5(1):58–65. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1758-2229.12019>
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. Wayne; 2012.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals (CLSI VET 015), 5th edn. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne; 2020a.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: CLSI supplement M100S, 30th edn. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne. 2020b.
- Constable PD. Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and ancillary treatments. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice [Internet]. março de 2009;25(1):101–20. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072008000996>
- da Costa P, Loureiro L, Matos A. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. Int J Environ Res Public Health [Internet]. 14 de janeiro de 2013;10(1):278–94. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1660-4601/10/1/278>
- Costa-Júnior SD, Ferreira YLA, Agreles MAA, Alves ÁEF, Melo de Oliveira MB, Cavalcanti IMF. Gram-negative bacilli carrying *mcr* gene in Brazil: a pathogen on the rise. Braz J Microbiol [Internet]. 21 de junho de 2023;54(2):1009–20. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s42770-023-00948-w>
- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev [Internet]. outubro de 2013;26(4):822–80. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00022-13>

- Daghrir R, Drogui P. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ Chem Lett* [Internet]. 1º de setembro de 2013;11(3):209–27. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10311-013-0404-8>
- Dallman TJ, Greig DR, Gharbia SE, Jenkins C. Phylogenetic context of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O26:H11 in England. *Microb Genom* [Internet]. 18 de setembro de 2021;7(6). Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000551>
- Darby EM, Trampari E, Siasat P, Gaya MS, Alav I, Webber MA, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 21 de maio de 2023;21(5):280–95. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-022-00820-y>
- Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 21 de janeiro de 2021;19(1):37–54. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-0416-x>
- Dias JA, Menezes CA de, Brito MAVP, Lange CC, Queiroz RB de. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* spp. isolates in cattle herds from Western Amazon. *Semin Cienc Agrar* [Internet]. 25 de março de 2022;43(3):1355–64. Disponível em: <https://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/44531>
- Diwan V, Hanna N, Purohit M, Chandran S, Riggi E, Parashar V, et al. Seasonal variations in water-quality, antibiotic residues, resistant bacteria and antibiotic resistance genes of *Escherichia coli* Isolates from *Water and Sediments* of the Kshipra River in central India. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 17 de junho de 2018;15(6):1281. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1660-4601/15/6/1281>
- Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Matté GR, Matté MH. Complex class 1 integrons harboring CTX-M-2-encoding genes in clinical Enterobacteriaceae from a hospital in Brazil. *Journal Infect Dev Ctries* [Internet]. 29 de agosto de 2015;9(08):890–7. Disponível em: <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/26322883>
- Du C, Feng Y, Wang G, Zhang Z, Hu H, Yu Y, et al. Co-Occurrence of the *mcr-1.1* and *mcr-3.7* genes in a multidrug-resistant *Escherichia coli* isolate from China. *Infect Drug Resist* [Internet]. outubro de 2020;13:3649–55. Disponível em: <https://test.dovepress.com/co-occurrence-of-the-mcr-11-and-mcr-37-genes-in-a-multidrug-resistant-peer-reviewed-article-IDR>
- Escherich T. The Intestinal Bacteria of the Neonate and Breast-Fed Infant. *Clin Infect Dis* [Internet]. 1º de novembro de 1988;10(6):1220–5. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/clinids/10.6.1220>
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Milk production [Internet]. 2023 [citado 17 de setembro de 2023]. Disponível em: <https://www.fao.org/dairy-production-products/production/en/>

- Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA, Moura Q, Pérez-Chaparro PJ, Esposito F, et al. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* sequence type 101 isolate from a human infection in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. outubro de 2016a;60(10):6415–7. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01325-16>
- Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Eurosurveillance* [Internet]. 28 de abril de 2016b;21(17). Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214>
- Florião MM. Boas práticas em bovinocultura leiteira com ênfase em sanidade preventiva. Programa Rio Rural. 2013;
- Foster-Nyarko E, Pallen MJ. The microbial ecology of *Escherichia coli* in the vertebrate gut. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 6 de maio de 2022;46(3). Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/doi/10.1093/femsre/fuac008/6522174>
- Frech G, Kehrenberg C, Schwarz S. Resistance phenotypes and genotypes of multiresistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* var. *Copenhagen* isolates from animal sources. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(1):180–2.
- Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. setembro de 2005;3(9):722–32. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1235>
- Fuentes-Castillo D, Navas-Suárez PE, Gondim MF, Esposito F, Sacristán C, Fontana H, et al. Genomic characterization of multidrug-resistant ESBL-producing *Escherichia coli* ST58 causing fatal colibacillosis in critically endangered Brazilian merganser (*Mergus octosetaceus*). *Transbound Emerg Dis* [Internet]. 2 de março de 2021;68(2):258–66. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed.13686>
- Fuga B, Sellera FP, Cerdeira L, Esposito F, Cardoso B, Fontana H, et al. WHO Critical priority *Escherichia coli* as one health challenge for a post-pandemic scenario: genomic surveillance and analysis of current trends in Brazil. Lainhart W, organizador. *Microbiol Spectr* [Internet]. 27 de abril de 2022;10(2). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.01256-21>
- Fukuda A, Usui M, Okamura M, Dong-Liang H, Tamura Y. Role of flies in the maintenance of antimicrobial resistance in farm environments. *Microbial Drug Resistance* [Internet]. janeiro de 2019;25(1):127–32. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2017.0371>
- Galetti R, Antonio Casarin Penha Filho R, Ferreira JC, M. Varani A, Costa Darini AL. Antibiotic resistance and heavy metal tolerance plasmids: the antimicrobial bulletproof properties of *Escherichia fergusonii* isolated from poultry. *Infect Drug Resist* [Internet].

- maio de 2019;12:1029–33. Disponível em: <https://www.dovepress.com/antibiotic-resistance-and-heavy-metal-tolerance-plasmids-the-antimicro-peer-reviewed-article-IDR>
- Gatzeva-Topalova PZ, May AP, Sousa MC. Structure and mechanism of *arnA*: conformational change implies ordered dehydrogenase mechanism in key enzyme for polymyxin resistance. *Structure* [Internet]. junho de 2005;13(6):929–42. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096921260500170X>
- Ghaly TM, Gillings MR, Penesyan A, Qi Q, Rajabal V, Tetu SG. The natural history of integrons. *Microorganisms* [Internet]. 25 de outubro de 2021;9(11):2212. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/11/2212>
- Gonzalez A, Cerqueira A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. *J Appl Microbiol* [Internet]. junho de 2020;128(6):1568–82. Disponível em: <https://academic.oup.com/jambio/article/128/6/1568/6718244>
- Goulart DB, Mellata M. *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle: etiology, diagnosis, and treatment challenges. *Front Microbiol* [Internet]. 7 de julho de 2022;13. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.928346/full>
- Grant JR, Enns E, Marinier E, Mandal A, Herman EK, Chen C yu, et al. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 4 de maio de 2023; Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/advance-article/doi/10.1093/nar/gkad326/7151341>
- Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard JM, Olsen JE, Dalsgaard A. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol*. 2000;49(10):929–36.
- Gullberg E, Albrecht LM, Karlsson C, Sandegren L, Andersson DI. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. Baquero F, organizador. *mBio* [Internet]. 31 de outubro de 2014;5(5). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01918-14>
- Hammad AM, Gonzalez-Escalona N, El Tahan A, Abbas NH, Koenig SSK, Allué-Guardia A, et al. Pathogenome comparison and global phylogeny of *Escherichia coli* ST1485 strains. *Sci Rep* [Internet]. 2 de novembro de 2022;12(1):18495. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-20342-0>
- Haque SZ, Haque M. The ecological community of commensal, symbiotic, and pathogenic gastrointestinal microorganisms – an appraisal. *Clin Exp Gastroenterol* [Internet]. maio de 2017;10:91–103. Disponível em: <https://www.dovepress.com/the-ecological-community-of-commensal-symbiotic-and-pathogenic-gastroi-peer-reviewed-article-CEG>
- Harmer CJ, Moran RA, Hall RM. Movement of IS 26 -Associated antibiotic resistance genes occurs via a translocatable unit that includes a single IS 26 and preferentially inserts

- adjacent to another IS 26. Bush K, organizador. mBio [Internet]. 31 de outubro de 2014;5(5). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01801-14>
- Haydon, DT; Cleaveland, S; Taylor, LH; Laurenson M. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. Emerg Infect Dis [Internet]. dezembro de 2002;8(12):1468–73. Disponível em: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/12/01-0317_article.htm
- He S, Hickman AB, Varani AM, Siguier P, Chandler M, Dekker JP, et al. Insertion sequence IS 26 reorganizes plasmids in clinically isolated multidrug-resistant bacteria by replicative transposition. Davies JE, organizador. mBio [Internet]. julho de 2015;6(3). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00762-15>
- Hickman RA, Agarwal V, Sjöström K, Emanuelson U, Fall N, Sternberg-Lewerin S, et al. Dissemination of resistant *Escherichia coli* among wild birds, rodents, flies, and calves on dairy farms. Front Microbiol [Internet]. 1º de abril de 2022;13. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.838339/full>
- van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. Front Microbiol [Internet]. 2011;2. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2011.00203/abstract>
- Hoffman JA, Badger JL, Zhang Y, Huang SH, Kim KS. *Escherichia coli* K1 *aslA* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo. Tuomanen EI, organizador. Infect Immun [Internet]. setembro de 2000;68(9):5062–7. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.68.9.5062-5067.2000>
- Huang X, Yu L, Chen X, Zhi C, Yao X, Liu Y, et al. High prevalence of colistin resistance and *mcr-1* gene in *Escherichia coli* isolated from food animals in China. Front Microbiol [Internet]. 4 de abril de 2017;8. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00562/full>
- Hughes D, Andersson DI. Evolutionary trajectories to antibiotic resistance. Annu Rev Microbiol [Internet]. 8 de setembro de 2017;71(1):579–96. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-090816-093813>
- Hussain HI, Aqib AI, Seleem MN, Shabbir MA, Hao H, Iqbal Z, et al. Genetic basis of molecular mechanisms in β -lactam resistant gram-negative bacteria. Microb Pathog [Internet]. setembro de 2021;158:105040. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401021003120>
- Jarlier V, Nicolas M, Fournier G PA. ESBLs conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae; hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis. 1988;10:867–78.
- Jauregui F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, et al. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. BMC Genomics

- [Internet]. 26 de dezembro de 2008;9(1):560. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-560>
- Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* [Internet]. 18 de julho de 2013a;14(7):685–90. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni.2608>
- Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 25 de maio de 2013b;13(5):321–35. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri3430>
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. fevereiro de 2004;2(2):123–40. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro818>
- Keen PL, Knapp CW, Hall KJ, Graham DW. Seasonal dynamics of tetracycline resistance gene transport in the Sumas River agricultural watershed of British Columbia, Canada. *Sci Total Environ* [Internet]. julho de 2018;628–629:490–8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718303206>
- Khachatourians GG. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *CMAJ* [Internet]. 3 de novembro de 1998;159(9):1129–36. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9835883>
- Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* [Internet]. dezembro de 1977;18(3):775–9. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.18.3.775-779.1977>
- Korb A, Kutzepa D, Teixeira D, Mendonça R. Riscos para a saúde humana do uso de antibióticos. *Revista de Saúde Pública de Santa Catarina*. 2011;4(1):21–36.
- Koutsoumanis K, Allende A, Álvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, et al. Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *EFSA Journal* [Internet]. junho de 2021;19(6). Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2021.6651>
- Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, et al. Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA Journal* [Internet]. janeiro de 2020;18(1). Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2020.5967>
- Kuraku S, Zmasek CM, Nishimura O, Katoh K. aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1º de julho de 2013;41(W1):W22–8. Disponível em: <http://academic.oup.com/nar/article/41/W1/W22/1099639/aLeaves-facilitates-ondemand-exploration-of>

- Labar AS, Millman JS, Ruebush E, Opintan JA, Bishar RA, Aboderin AO, et al. Regional dissemination of a trimethoprim-resistance gene cassette via a successful transposable element. *PLoS One*. 2012;7(5):1–10.
- Lagerstrom KM, Hadly EA. Under-appreciated phylogroup diversity of *Escherichia coli* within and between animals at the urban-wildland interface. Dozois CM, organizador. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 28 de junho de 2023;89(6). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.00142-23>
- Larsson DGJ, Flach CF. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 4 de maio de 2022;20(5):257–69. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-021-00649-x>
- Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. Em: Dobrindt, U., Hacker, J., Svanborg C, organizador. *Between pathogenicity and commensalism* [Internet]. Berlin: Springer; 2013. p. 3–32. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/82_2012_303
- Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. janeiro de 1995;39(1):185–91. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.39.1.185>
- Li Z, Cao Y, Yi L, Liu JH, Yang Q. Emergent polymyxin resistance: end of an era? *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 1º de outubro de 2019;6(10). Disponível em: <https://academic.oup.com/ofid/article/doi/10.1093/ofid/ofz368/5550895>
- Liebana E, Batchelor M, Hopkins KL, Clifton-Hadley FA, Teale CJ, Foster A, et al. Longitudinal farm study of extended-spectrum β -lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol* [Internet]. maio de 2006;44(5):1630–4. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.44.5.1630-1634.2006>
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. fevereiro de 2016;16(2):161–8.
- Łobocka MB, Rose DJ, Plunkett G, Rusin M, Samojedny A, Lehnerr H, et al. Genome of bacteriophage P1. *J Bacteriol* [Internet]. novembro de 2004;186(21):7032–68. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.186.21.7032-7068.2004>
- Lopatkin AJ, Huang S, Smith RP, Srimani JK, Sysoeva TA, Bewick S, et al. Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics. *Nat Microbiol* [Internet]. 11 de abril de 2016;1(6):16044. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol201644>
- Lu S, Jin D, Wu S, Yang J, Lan R, Bai X, et al. Insights into the evolution of pathogenicity of *Escherichia coli* from genomic analysis of intestinal *E. coli* of *Marmota himalayana* in Qinghai–Tibet plateau of China. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 25 de janeiro de

- 2016;5(1):1–9. Disponível em:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/emi.2016.122>
- MacFadden DR, McGough SF, Fisman D, Santillana M, Brownstein JS. Antibiotic resistance increases with local temperature. *Nat Clim Chang* [Internet]. 21 de junho de 2018;8(6):510–4. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41558-018-0161-6>
- Machado E, Canto R, Baquero F, Gala J carlos, Coque TM. Integron content of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(5):1823–9.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2012;18(3):268–81. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Malberg Tetzschner AM, Johnson JR, Johnston BD, Lund O, Scheutz F. In silico genotyping of *Escherichia coli* isolates for extraintestinal virulence genes by use of whole-genome sequencing data. Dekker JP, organizador. *J Clin Microbiol* [Internet]. 22 de setembro de 2020;58(10). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01269-20>
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº45 [Internet]. 2016 [citado 26 de fevereiro de 2020]. Disponível em:
https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22078290/doi-10.1128/JCM.01269-20
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº26 [Internet]. 2009. Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumosagropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-26-de-9-de-julho-de-2009.pdf/view>
- Marshall BM, Levy SB. Food Animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. outubro de 2011;24(4):718–33. Disponível em:
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00002-11>
- Marshall BM, Ochieng DJ, Levy SB. Commensals: underappreciated reservoir of antibiotic resistance. *Microbe Magazine* [Internet]. 1º de maio de 2009;4(5):231–8. Disponível em:
<http://www.asmscience.org/content/journal/microbe/10.1128/microbe.4.231.1>
- Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. agosto de 2006;4(8):608–20. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1462>

- Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(6):1568–74.
- McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial resistance: a One Health perspective. Aarestrup FM, Schwarz S, Shen J, Cavaco L, organizadores. *Microbiol Spectr* [Internet]. 6 de abril de 2018;6(2). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
- Mendes Oliveira VR, Paiva MC, Lima WG. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: a systematic review. *Travel Med Infect Dis*. setembro de 2019;31:101459.
- Montero DA, Canto F Del, Velasco J, Colello R, Padola NL, Salazar JC, et al. Cumulative acquisition of pathogenicity islands has shaped virulence potential and contributed to the emergence of LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 1º de janeiro de 2019;8(1):486–502. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2019.1595985>
- Neoh H min, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): a review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol* [Internet]. outubro de 2019;74:103935. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156713481930156X>
- Nesta B, Spraggon G, Alteri C, Gomes Moriel D, Rosini R, Veggi D, et al. *fdeC*, a novel broadly conserved *Escherichia coli* adhesin eliciting protection against urinary tract infections. Schubert S, Pier G, organizadores. *mBio* [Internet]. 2 de maio de 2012;3(2). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00010-12>
- Novais C, Freitas AR, Silveira E, Antunes P, Silva R, Coque TM, et al. Spread of multidrug-resistant *Enterococcus* to animals and humans: an underestimated role for the pig farm environment. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1º de dezembro de 2013;68(12):2746–54. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkt289>
- O’Brien TF. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin Infect Dis* [Internet]. junho de 2002;34(s3):S78–84. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/340244>
- Ogura Y, Ooka T, Iguchi A, Toh H, Asadulghani M, Oshima K, et al. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 20 de outubro de 2009;106(42):17939–44. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0903585106>
- Ojeniyi B, Ahrens P, Meyling A. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. *J Vet Med* [Internet]. 12 de janeiro de

- 1994;41(1–10):49–59. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0450.1994.tb00205.x>
- Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* [Internet]. 26 de novembro de 2014;5. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00643/abstract>
- Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. janeiro de 2016;47(1):1–3. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857915004008>
- Olaru ID, Walther B, Schaumburg F. Zoonotic sources and the spread of antimicrobial resistance from the perspective of low and middle-income countries. *Infect Dis Poverty* [Internet]. 14 de junho de 2023;12(1):59. Disponível em:
<https://idpjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40249-023-01113-z>
- Oliveira CC, Lopes ES, Barbosa DR, Pimenta RL, Sobrinho NMBA, Coelho SMO, et al. Occurrence of the colistin resistance *mcr* -1 gene in soils from intensive vegetable production and native vegetation. *Eur J Soil Sci.* maio de 2019;ejss.12832.
- Oliver SP, Murinda SE. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* [Internet]. julho de 2012;28(2):165–85. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072012000229>
- Onwugamba FC, Fitzgerald JR, Rochon K, Guardabassi L, Alabi A, Kühne S, et al. The role of ‘filth flies’ in the spread of antimicrobial resistance. *Travel Med Infect Dis* [Internet]. março de 2018;22:8–17. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1477893918300371>
- O’Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp* [Internet]. 30 de janeiro de 2011;(47). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21307833>
- Pacheco AR, Sperandio V. Shiga toxin in enterohemorrhagic *E.coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2012;2. Disponível em:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2012.00081/abstract>
- Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G, Hirten R, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* [Internet]. março de 2018;67(3):574–87. Disponível em: <https://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2017-314903>
- Park R, Dzialo MC, Spaepen S, Nsabimana D, Gielens K, Devriese H, et al. Microbial communities of the house fly *Musca domestica* vary with geographical location and habitat. *Microbiome* [Internet]. 8 de dezembro de 2019;7(1):147. Disponível em:
<https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-019-0748-9>

- Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. outubro de 2018;31(4). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00088-17>
- Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1* , *stx2* , *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA* , *rfb* O111, and *rfb* O157. *J Clin Microbiol* [Internet]. fevereiro de 1998;36(2):598–602. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.36.2.598-602.1998>
- Paton AW, Paton JC. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae* , *ehxA* , and *saa*. *J Clin Microbiol* [Internet]. janeiro de 2002;40(1):271–4. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.40.1.271-274.2002>
- Pfeifer E, Bonnin RA, Rocha EPC. Phage-plasmids spread antibiotic resistance genes through infection and lysogenic conversion. Goldman GH, organizador. *mBio* [Internet]. 26 de outubro de 2022;13(5). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.01851-22>
- Piazza RMF, Delannoy S, Fach P, Saridakis HO, Pedroso MZ, Rocha LB, et al. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* O26:H8 among diarrheagenic *E. coli* O26 strains isolated in Brazil. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 15 de novembro de 2013;79(22):6847–54. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01693-13>
- Piérard D, De Greve H, Haesebrouck F, Mainil J. O157:H7 and O104:H4 Vero/Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreaks: respective role of cattle and humans. *Vet Res* [Internet]. 13 de dezembro de 2012;43(1):13. Disponível em: <https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/1297-9716-43-13>
- Povolný D. Flies and disease: ecology, classification and biotic associations. Em: B. G, organizador. *Flies and disease: Ecology, classification and biotic associations*. Vol. 1. New Jersey; 1971. p. 17–54.
- Puri-Giri R, Ghosh A, Thomson JL, Zurek L. House flies in the confined cattle environment carry non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Med Entomol* [Internet]. 1º de maio de 2017;54(3):726–32. Disponível em: <https://academic.oup.com/jme/article/54/3/726/3061469>
- Qi Q, Rajabal V, Ghaly TM, Tetu SG, Gillings MR. Identification of integrons and gene cassette-associated recombination sites in bacteriophage genomes. *Front Microbiol* [Internet]. 19 de janeiro de 2023;14. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1091391/full>
- Rabello RF, Bonelli RR, Penna BA, Albuquerque JP, Souza RM, Cerqueira AMF. Antimicrobial resistance in farm animals in Brazil: An Update Overview. *Animals*

- [Internet]. 26 de março de 2020;10(4):552. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/4/552>
- Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance*. 2018;23(6):1–11.
- Rhouma M, Madec JY, Laxminarayan R. Colistin: from the shadows to a One Health approach for addressing antimicrobial resistance. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. fevereiro de 2023;61(2):106713. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857923000055>
- Ribeiro MG. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. Em: Andrade SF, organizador. *Manual de Terapêutica Veterinária*. 3º ed São Paulo: Roca; 2008. p. 759–71.
- Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* [Internet]. março de 2006;3(1):59–67. Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2006.3.59>
- Rodwell E V., Simpson A, Chan YW, Godbole G, McCarthy ND, Jenkins C. The epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 (clonal complex 29) in England, 2014–2021. *J Infect* [Internet]. junho de 2023;86(6):552–62. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445323002062>
- Royster E, Wagner S. Treatment of mastitis in cattle. *Veterinary clinics of North America: food animal practice* [Internet]. março de 2015;31(1):17–46. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072014000905>
- Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* [Internet]. maio de 2000;181(5):1753–4. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/315418>
- Samreen, Ahmad I, Malak HA, Abulreesh HH. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. dezembro de 2021;27:101–11. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213716521001910>
- Sano E, Esposito F, Fontana H, Fuga B, Cardenas-Arias A, Moura Q, et al. One health clones of multidrug-resistant *Escherichia coli* carried by synanthropic animals in Brazil. *One Health* [Internet]. junho de 2023;16:100476. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352771422001082>

- Sarowska J, Futoma-Koloch B, Jama-Kmiecik A, Frej-Madrzak M, Ksiazczyk M, Bugla-Ploskonska G, et al. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. Gut Pathog [Internet]. 21 de dezembro de 2019;11(1):10. Disponível em: <https://gutpathogens.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13099-019-0290-0>
- Schaechter M. *Escherichia coli*. Em: Encyclopedia of Microbiology [Internet]. Elsevier; 2009. p. 125–32. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123739445000596>
- Scheutz F, Strockbine NA. *Escherichia*. Em: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria [Internet]. Wiley; 2015. p. 1–49. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm01147>
- SEBRAE. Mapeamento técnico para a região de articuladores de Botucatu [Internet]. Botucatu; 2021. Disponível em: <https://datasebrae.com.br/wp-content/uploads/2020/10/Botucatu-Sumário-Executivo.pdf>
- Shaw DJ, Jenkins C, Pearce MC, Cheasty T, Gunn GJ, Dougan G, et al. shedding patterns of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strains in a cohort of calves and their dams on a scottish beef farm. Appl Environ Microbiol [Internet]. dezembro de 2004;70(12):7456–65. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.70.12.7456-7465.2004>
- Sheikh J, Hicks S, Dall'Agnol M, Phillips AD, Nataro JP. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. Mol Microbiol [Internet]. setembro de 2001;41(5):983–97. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11555281>
- Sherry N, Howden B. Emerging Gram-negative resistance to last-line antimicrobial agents fosfomicin, colistin and ceftazidime-avibactam – epidemiology, laboratory detection and treatment implications. Expert Rev Anti Infect Ther. 3 de abril de 2018;16(4):289–306.
- Shpigel NY, Elazar S, Rosenshine I. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. Curr Opin Microbiol [Internet]. fevereiro de 2008;11(1):60–5. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527408000052>
- Silva KC da, Knobel T, Moreno AM. Resistência a antimicrobianos em medicina veterinária: mecanismos e agentes bacterianos de maior impacto em saúde humana. Braz J Vet Res Anim Sci [Internet]. 21 de junho de 2013;50(3):171. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/64538>
- Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EPC, de la Cruz F. Mobility of plasmids. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. setembro de 2010;74(3):434–52. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MMBR.00020-10>
- Solà-Ginés M, González-López JJ, Cameron-Veas K, Piedra-Carrasco N, Cerdà-Cuellar M, Migura-Garcia L. Houseflies (*Musca domestica*) as vectors for extended-spectrum β -

- lactamase-producing *Escherichia coli* on Spanish broiler farms. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(11):3604–11.
- Sora VM, Meroni G, Martino PA, Soggiu A, Bonizzi L, Zecconi A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: virulence factors and antibiotic resistance. *Pathogens* [Internet]. 20 de outubro de 2021;10(11):1355. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/11/1355>
- Soufi L, Abbassi MS, Sáenz Y, Vinué L, Somalo S, Zarazaga M, et al. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. *Foodborne Pathog Dis* [Internet]. novembro de 2009;6(9):1067–73. Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2009.0284>
- Srednik ME, Morningstar-Shaw BR, Hicks JA, Tong C, Mackie TA, Schlater LK. Whole-genome sequencing and phylogenetic analysis capture the emergence of a multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar *Infantis* clone from diagnostic animal samples in the United States. *Front Microbiol* [Internet]. 2 de junho de 2023;14. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1166908/full>
- Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* [Internet]. 1º de novembro de 2006;22(21):2688–90. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/22/21/2688/251208>
- Sun J, Fang LX, Wu Z, Deng H, Yang RS, Li XP, et al. Genetic analysis of the IncX4 plasmids: implications for a unique pattern in the *mcr-1* acquisition. *Sci Rep* [Internet]. 24 de março de 2017;7(1):424. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-00095-x>
- Tanih NF, Bolick DT, Samie A, Nyathi E, Dillingham R, Pinkerton RC, et al. Prevalence of virulence genes in enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from young children from rural South Africa. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 6 de novembro de 2019;101(5):1027–33. Disponível em: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.19-0192>
- Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. março de 2010;8(3):207–17. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2298>
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* [Internet]. setembro de 1995;33(9):2233–9. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995>
- Toledo, M.R.F.; Fontes, C.F.; Trabulsi LR. EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. *Revista de Microbiologia*. 1982a;13:309–15.

- Toledo, M.R.F.; Fontes, C.F.; Trabulsi LR. MILi: um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. *Revista de Microbiologia*. 1982b;13:230–5.
- Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, et al. β -Lactamases and β -Lactamase inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol* [Internet]. agosto de 2019;431(18):3472–500. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283619301822>
- Usui M, Iwasa T, Fukuda A, Sato T, Okubo T, Tamura Y. The role of flies in spreading the extended-spectrum β -lactamase gene from cattle. *Microb Drug Resist* [Internet]. 2013;19(5):415–20. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/mdr.2012.0251>
- Vasco K, Nohomovich B, Singh P, Venegas-Vargas C, Mosci RE, Rust S, et al. Characterizing the cattle gut microbiome in farms with a high and low prevalence of Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Microorganisms* [Internet]. 14 de agosto de 2021;9(8):1737. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/8/1737>
- Vélez MV, Colello R, Etcheverría AI, Vidal RM, Montero DA, Acuña P, et al. Distribution of locus of adhesion and autoaggregation and *hes* gene in STEC strains from countries of Latin America. *Curr Microbiol* [Internet]. 5 de setembro de 2020;77(9):2111–7. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s00284-020-02062-8>
- Vélez MV, Colello R, Etcheverría S, Etcheverría AI, Padola NL. Biofilm formation by LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Microb Pathog* [Internet]. agosto de 2021;157:105006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401021002783>
- de Verdier K, Nyman A, Greko C, Bengtsson B. Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from swedish dairy calves. *Acta Vet Scand* [Internet]. 26 de dezembro de 2012;54(1):2. Disponível em: <https://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/1751-0147-54-2>
- Vieira AR, Collignon P, Aarestrup FM, McEwen SA, Hendriksen RS, Hald T, et al. Association between antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals and blood stream isolates from humans in Europe: an ecological study. *Foodborne Pathog Dis* [Internet]. dezembro de 2011;8(12):1295–301. Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2011.0950>
- Wang W, Yu L, Hao W, Zhang F, Jiang M, Zhao S, et al. Multi-locus sequence typing and drug resistance analysis of swine origin *Escherichia coli* in shandong of China and its potential risk on public health. *Front Public Health* [Internet]. 2 de dezembro de 2021;9. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2021.780700/full>
- Wattam AR, Davis JJ, Assaf R, Boisvert S, Brettin T, Bun C, et al. Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource center. *Nucleic*

- Acids Res [Internet]. 4 de janeiro de 2017;45(D1):D535–42. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw1017>
- WHO. Global Antimicrobial resistance surveillance system (GLASS): the detection and reporting of colistin resistance [Internet]. Geneva; 2018. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/277175>
- Wichmann F, Udikovic-Kolic N, Andrew S, Handelsman J. Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure. Zhou J, organizador. mBio [Internet]. maio de 2014;5(2). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01017-13>
- Winn Jr, W.C.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Koneman, E.W.; Procop, G.; Schreckenberger, P.C.; Woods G. Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido. 6º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol Microbiol [Internet]. junho de 2006;60(5):1136–51. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>
- Xu C, Kong L, Gao H, Cheng X, Wang X. A review of current bacterial resistance to antibiotics in food animals. Front Microbiol [Internet]. 12 de maio de 2022;13. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.822689/full>
- Xu T, Zhang C, Ji Y, Song J, Liu Y, Guo Y, et al. Identification of *mcr-10* carried by self-transmissible plasmids and chromosome in *Enterobacter roggenkampii* strains isolated from hospital sewage water. Environmental Pollution [Internet]. 2021;268:115706. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115706>
- Yano B, Taniguchi I, Gotoh Y, Hayashi T, Nakamura K. Dynamic changes in Shiga toxin (Stx) 1 transducing phage throughout the evolution of O26:H11 Stx-producing *Escherichia coli*. Sci Rep [Internet]. 27 de março de 2023;13(1):4935. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-023-32111-8>
- Yin JH, Kelly PJ, Wang C. Flies as vectors and potential sentinels for bacterial pathogens and antimicrobial resistance: a review. Vet Sci [Internet]. 16 de junho de 2022;9(6):300. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-7381/9/6/300>
- Yu D, Banting G, Neumann NF. A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. Can J Microbiol [Internet]. agosto de 2021;67(8):553–71. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/cjm-2020-0508>
- Yu J, Kaper JB. Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Mol Microbiol [Internet]. fevereiro de 1992;6(3):411–7. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01484.x>

- Zamparette CP, Schorner M, Campos E, Moura Q, Cerdeira L, Tartari DC, et al. IncX4 plasmid-mediated *mcr-1.1* in polymyxin-resistant *Escherichia coli* from outpatients in Santa Catarina, Southern Brazil. *Microb Drug Resist* [Internet]. 1º de novembro de 2020;26(11):1326–33. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2019.0203>
- Zhang Y, Liao YT, Salvador A, Lavenburg VM, Wu VCH. Characterization of two new Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103-infecting phages isolated from an organic farm. *Microorganisms* [Internet]. 17 de julho de 2021;9(7):1527. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/7/1527>
- Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 15 de fevereiro de 2013;39(1):79–101. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2012.691460>
- Zoccal R. A atividade leiteira retratada no Censo Agropecuário 2017. Balde Branco [Internet]. 2018;53(646):16–7. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1097235>
- Zurfluh K, Nüesch-Inderbilen M, Klumpp J, Poirel L, Nordmann P, Stephan R. Key features of *mcr-1*-bearing plasmids from *Escherichia coli* isolated from humans and food. *Antimicrob Resist Infect Control* [Internet]. 6 de dezembro de 2017;6(1):91. Disponível em: <http://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-017-0250-8>

ANEXO A - Informação CEUA

UNICAMP



CEUA/UNICAMP



2066/2017

**INFORMAÇÃO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP - CEUA/UNICAMP - esclarece que não há necessidade de submeter o projeto intitulado Determinação da resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli* de origem animal e efeito na disseminação da resistência no ambiente -pesquisa em cepas comensais e produtoras de toxina Shiga, de responsabilidade do Prof. Dr. Domingos da Silva Leite (orientador) e Taila dos Santos Alves (doutoranda), para análise desta Comissão.

Justifica-se por se tratar de uso de amostras de fezes colhidas de equinos, bovinos, caninos e ovinos doadas pelo Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu.

Campinas, 10 de agosto de 2017.

Prof. Dr. WAGNER JOSÉ FÁVARO
Presidente da CEUA/UNICAMP

ANEXO B – Declaração referente à bioética e biossegurança

COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br

**DECLARAÇÃO**

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada “**Determinação da resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli* de origem animal e o efeito na disseminação da resistência no ambiente - pesquisa em cepas comensais e produtoras de toxina Shiga**”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Taíla dos Santos Alves
Nome do(a) aluno(a): Taíla dos Santos Alves

Assinatura: Domingos da Silva Leite
Nome do(a) orientador(a): Domingos da Silva Leite

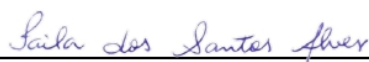
Data: 22/11/2023

ANEXO C – Declaração sobre direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Determinação da resistência a antimicrobianos em Escherichia coli de origem animal e o efeito na disseminação da resistência no ambiente - pesquisa em cepas comensais e produtoras de toxina Shiga**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 22 de novembro de 2023.

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Taila dos Santos Alves**
RG n.º 44576276-7

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Domingos da Silva Leite**
RG n.º 9161567-7