



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LARISSA MELO CHICOSKI

**CARACTERIZAÇÃO DE *ENTEROBACTERIACEAE*
PRODUTORAS DE ESBL, AMPC E CARBAPENEMASES
ISOLADAS EM AMOSTRAS DE ANIMAIS DE COMPANHIA E
DE PRODUÇÃO**

Londrina
2024

LARISSA MELO CHICOSKI

**CARACTERIZAÇÃO DE *ENTEROBACTERIACEAE*
PRODUTORAS DE ESBL, AMPC E CARBAPENEMASES
ISOLADAS EM AMOSTRAS DE ANIMAIS DE COMPANHIA E
DE PRODUÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C532c Chicoski, Larissa Melo.
Caracterização de enterobacteriaceae produtoras de ESBL, AmpC e carbapenemases isoladas em amostras de animais de companhia e de produção / Larissa Melo Chicoski. - Londrina, 2024.
146 f. : il.

Orientador: Ulisses de Pádua Pereira.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Beta-lactamases - Tese. 2. Bactérias resistentes a antibióticos - Tese. 3. Escherichia coli - Tese. 4. Klebsiella spp - Tese. I. Pereira, Ulisses de Pádua . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 63

LARISSA MELO CHICOSKI

**CARACTERIZAÇÃO DE *ENTEROBACTERIACEAE*
PRODUTORAS DE ESBL, AMPC E CARBAPENEMASES
ISOLADAS EM AMOSTRAS DE ANIMAIS DE COMPANHIA E
DE PRODUÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Orientador: Dr. Ulisses de Pádua
Pereira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Alais Maria Dall Agnol
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Universidade Federal do Vale do São
Francisco - UNIVASF

Londrina, 13 de junho de 2024.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pelo dom da fé, pelo privilégio do estudo, e entendimento. Pela proteção diária e por se fazer conhecer por entre os meus.

Aos meus pais pelo amor incondicional e confiança. À Dulcine Chicowski, educadora e mãe, materialização do amor. A José Luiz Chicowski, pai e provedor, colo e conforto. Ao meu irmão, Christian Chicowski, com quem divido meu passado e futuro.

Aos meus mestres e professores, que fizeram da educação a sua vida. Ao meu orientador, Prof. Dr. Ulisses Pereira, pela oportunidade e orientação. A Prof^a Dr^a Floristher Carrara, do departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Prof^a Dr^a Alais Dall Agnol e Prof^a Dr^a Alice Alfieri, do departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Estadual de Londrina, e a Prof^a Dr^a Lygia Terasawa, do departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, pelos recursos, tempo e materiais, a parceria, o carinho e a paciência a mim despendidos para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos, socorro bem presente na tribulação. Em especial aos que tenho a alegria de dividir minha vida há anos, Gabriela Dames e as companheiras de mestrado, Samanta Stinghen e Stael Mágala. Também aos colegas de laboratório por anos amizade e de cooperação científica, Natália Amoroso, Arthur da Costa, Ellen Meneguzzi, Eduardo Pereira, Raffaella Mainardi.

Gostaria de estender meus agradecimentos às equipes de laboratórios que generosamente compartilharam seu conhecimento e experiência para realização desse projeto: Maísa Menck, do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada do departamento de Microbiologia, Ronaldo Tamanini, do Laboratório de Inspeção de Leite e derivados, Juliana Fritzen e Elis Lorenzetti, do Laboratório de Virologia Animal, do departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Agradeço a Helenice Kieski, secretária do programa de pós-graduação em Ciência Animal, pela disposição e ternura.

A Universidade Estadual de Londrina, em especial ao programa de pós-graduação em Ciência Animal e ao seu corpo docente, pelas diretrizes, e por permitir a realização desse trabalho. Por fim, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

“Where the telescope ends, the microscope begins.
Which of the two has the grander view?”

Victor Hugo

CHICOKI, Larissa Melo. **Caracterização de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, AmpC e carbapenemases isoladas em amostras de animais de companhia e de produção.** 2024. 146fls. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

O uso inadequado de antimicrobianos favoreceu a seleção e disseminação de cepas bacterianas resistentes, uma ameaça à saúde única. *Enterobacteriaceae* são responsáveis por infecções recorrentes e apresentam eminente resistência a medicamentos. Enzimas presentes nessas bactérias conferem resistência a beta-lactâmicos, relacionadas com falha terapêutica e alta mortalidade dos pacientes. O objetivo desse estudo foi detectar a produção de beta lactamases tipo espectro estendido (ESBL), Ampicilinase (AmpC) e carbapenemases e a presença dos genes codificadores para essas enzimas em *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. isolados de amostras de animais. Foram selecionados 130 isolados multirresistentes (MR), no período de seis anos (2016-2021) provenientes de secreções (otológica, nasal, leite, bile e líquido abdominal), excreções (fezes e urina) e órgãos (pele, sangue, mucosa vesical, baço, fígado, rim, endométrio, olho e articulação) de animais das espécies canina, felina, bovina, equina e de peixes. Todas as amostras foram identificadas por provas bioquímicas e submetidas ao teste de sensibilidade a aminoglicosídeos, anfenicóis, beta-lactâmicos, macrolídeos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclinas para classificação de grau de multirresistência, e a detecção fenotípica de produção de ESBL, AmpC e carbapenemases por teste de Hodge modificado (THM), método de inativação de carbapenêmicos (mCIM) e de inativação de carbapenêmicos com EDTA (eCIM). Realizou-se a extração do DNA dos isolados por fervura (95° por 15 minutos) seguidos da detecção de genes tipo serino-beta-lactamase, metalo-beta-lactamases e carbapenemases por de protocolos de reação de cadeia polimerase (PCR) e *multiplex* PCR (mPCR). Dos 98 isolados de *E. coli*, 87,75% foram reconhecidos como MR, sendo fenotipicamente 28,57% produtores de ESBL, 16,32% de AmpC e 22,44% de carbapenemases. Isolados de *Klebsiella* spp. (n=28) 85,71% foram MR, 50,0% expressaram ESBL, 14,28% AmpC, 25,0% carbapenemases. Todos os isolados de *Proteus* spp. expressaram presença de carbapenemases (n=4), metade foi classificada como MR e 75% dos recuperados apresentaram resistência a cefoxitina. Foram detectados genes do grupo CTX-M em 56,12% das *E. coli*, sendo 58,18% (32/55) CTX-M-1, 38,18% CTX-M-2, 12,72% CTX-M-8, 16,63% CTX-M-9, e do grupo AmpC em 9,18%, sendo 77,77% (7/9) CMY-2 e 11,11% DHA e FOX-1 cada. Em 82,14% das *Klebsiella* spp. foram detectados genes CTX-M, sendo 75,0% CTX-M-1 e 10,71% CTX-M-2. Não houve detecção de genes AmpC nesse gênero. Nenhum isolado de *Proteus* spp. expressou ESBL ou teve detecção do grupo CTX-M, mas em 50% foi possível detectar genes AmpC, todos CMY-2. Genes de carbapenemases foram encontrados apenas em *Klebsiella* spp., 1 isolado (3,57%) detectado *blaKPC-2* e 2 (7,14%) *blaNDM*. Todos os isolados foram negativos para IMP, GIM, SIM, SPM, VIM e OXA-48. Os produtos da PCR detectados foram sequenciados e depositados no NCBI. Este estudo revela uma frequência crítica de *Enterobacteriaceae* que possuem genes plasmidiais de resistência antibacteriana isolado em animais, e que representam uma ameaça significativa à saúde única.

Palavras-chave: Beta-lactamases. Bactérias resistentes a antibióticos. *Escherichia coli*. *Klebsiella* spp. Multirresistente. *Proteus* spp.

CHICOKI, Larissa Melo. **Characterization of *Enterobacteriaceae* producing ESBL, AmpC, and carbapenemases isolated in samples from companion and production animals.** 2024. 146p. Dissertation (master's degree in animal science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

ABSTRACT

The inappropriate use of antimicrobials has favored the selection and spread of resistant bacterial strains, posing a One health threat. *Enterobacteriaceae* are responsible for recurrent infections and present eminent drug resistance. Enzymes present in these bacteria confer resistance to beta-lactams, linked to therapeutic failure and high patient mortality. The aim of this study was to detect the production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), Ampicillinases (AmpC), and carbapenemases, as well as the presence of genes encoding these enzymes in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus* spp. isolated from animal samples. The number of 130 multidrug-resistant (MDR) were isolates over a six-year period (2016-2021) from secretions (otological, nasal, milk, bile, and abdominal fluid), excretions (feces and urine), and organs (skin, blood, bladder mucosa, spleen, liver, kidney, endometrium, eye, and joint) of animals including canine, feline, bovine, equine, and fish species. All samples were identified through biochemical assays and subjected to sensitivity testing against aminoglycosides, phenicols, beta-lactams, macrolides, quinolones, sulfonamides, and tetracyclines to classify the degree of multidrug resistance. Phenotypic detection of ESBL, AmpC, and carbapenemases production was carried out using modified Hodge test (MHT), modified carbapenem inactivation method (mCIM), and carbapenem inactivation method with EDTA (eCIM). The DNA of the isolates were extracted by boiling (95°C for 15 minutes), followed by detection of serine-beta-lactamase, metallo-beta-lactamase, and carbapenemases genes using polymerase chain reaction (PCR) and multiplex PCR (mPCR) protocols. Of the 98 *E. coli* isolates, 87.75% were identified as MDR, with 28.57% phenotypically producing ESBLs, 16.32% AmpC, and 22.44% carbapenemases. Among *Klebsiella* spp. isolates (n=28), 85.71% were MDR, with 50.0% expressing ESBLs, 14.28% AmpC, and 25.0% carbapenemases. All *Proteus* spp. isolates expressed carbapenemases (n=4), with half being classified as MDR, and 75% showing resistance to ceftiofur. CTX-M group genes were detected in 56.12% of *E. coli* isolates, with 58.18% (32/55) CTX-M-1, 38.18% CTX-M-2, 12.72% CTX-M-8, and 16.63% CTX-M-9. AmpC group genes were detected in 9.18%, with 77.77% (7/9) CMY-2, and 11.11% each for DHA and FOX-1. CTX-M genes were found in 82.14% of *Klebsiella* spp. isolates, with 75.0% CTX-M-1 and 10.71% CTX-M-2. AmpC genes were not detected in this genus. No ESBL expression or CTX-M group detection was found in *Proteus* spp., but AmpC genes were detected in 50%, all of which were CMY-2. Carbapenemase genes were only found in *Klebsiella* spp., with 1 isolate (3.57%) detected blaKPC-2 and 2 (7.14%) blaNDM. All isolates were negative for IMP, GIM, SIM, SPM, VIM, and OXA-48. The PCR products detected were sequenced and deposited in the NCBI database. This study reveals a critical frequency of *Enterobacteriaceae* harboring plasmid-mediated genes for antibacterial resistance in animals, posing a significant threat to One health.

Keywords: Antibiotic-resistant bacteria. Beta-lactamases. *Escherichia coli*. *Klebsiella* spp. Multidrug resistant. *Proteus* spp.

LISTA DE FIGURAS (REVISÃO)

Figura 1 – Alvos de ação de diferentes classes de antibacterianos.....	30
Figura 2 – Estrutura química dos compostos das quatro subclasses de Beta-lactâmicos	31
Figura 3 – Teste fenotípico de produção de Beta Lactamases tipo Espectro Estendido (ESBL)	55
Figura 4 – Teste fenotípico para produção de Ampicilinase C (AmpC)	57
Figura 5 – Teste de Hodge Modificado (THM) em placa de ágar Mueller-Hilton	59
Figura 6 – Método da inativação da carbapenemase modificado (mCIM) e Método de inativação de carbapenemase por EDTA (eCIM)	59

LISTA DE FIGURAS (ARTIGO)

Figure 1 – Resistance of <i>Escherichia coli</i> isolates ($n=98$) to antimicrobial agents tested and separated by common classes (A-G) and by the division of antibiotic categories proposed by Magiorakos et al. (2012)	101
Figure 2 – Resistance of <i>Klebsiella</i> spp. isolates ($n=28$) to antimicrobial agents tested and separated by usual classes (A-G) and by the division of antibiotic categories proposed by Magiorakos et al. (2012)	102
Figure 3 – Resistance of <i>Proteus</i> spp. isolates ($n=4$) to antimicrobial agents tested and separated by usual classes (A-G) and by the division of antibiotic categories proposed by Magiorakos et al. (2012)	103

LISTA DE TABELAS (ARTIGO)

Table 1 – Distribution of bacterial isolation by animal species	99
Table 2 – Isolates classified as multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) by bacterial species isolated	104
Table 3 – Percentage of pathogenic agents resistant by classes according to Magiorakos et al. (2012) [18] classification.....	104
Table 4 – Resistance of <i>E. coli</i> and <i>Klebsiella</i> spp. to antibiotics within classes and resistance capacity by comparison	105
Table 5 – Percentage of positive samples in phenotypic tests by bacterial isolate species	106
Table 6 – Characteristics of ESBL-positive isolates detected in animal biological samples (<i>E. coli</i>)	108
Table 7 – Characteristics of ESBL-carrying isolates detected in animal biological samples (<i>Klebsiella</i> spp.)	111
Table 8 – Characteristics of isolates carrying AmpC group genes detected in animal biological samples	112
Table 9 – Characteristics of isolates carrying carbapenemases detected in animal biological samples	112
Table 10 – Profile of isolates for detectable resistance genes	113

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO – MATERIAL SUPLEMENTAR

Table 1 – Antimicrobial agents used in the antibiogram	133
Table 2 – Target genes, nucleotide sequence of primers used in polymerase chain reactions (PCR) and multiplex polymerase chain reaction (mPCR) expected amplicon size.....	134
Table 3 – Mix used in polymerase chain reaction (PCR) and multiplex polymerase chain reaction (mPCR) amplification protocols.....	136
Table 4 – Polymerase chain reaction (PCR) and multiplex polymerase chain reaction (mPCR) amplification protocols protocols.....	137
Table 5 – Resistance profile of isolates by Magiorakos et al. (2012)	138
Table 6 – GenBank record sequence of sequenced species.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Gene ACC-1 de AmpC beta-lactamase
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
AcrA	<i>Multidrug efflux pump subunit</i> AcrA (Proteína adaptadora periplasmática do complexo proteico de efluxo de moléculas antibacterianas)
AcrB	<i>Multidrug efflux pump subunit</i> AcrB (Transportador de membrana interna do complexo proteico de efluxo de moléculas antibacterianas)
AK	<i>Amikacin</i> (Amicacina)
AMC	<i>Amoxicillin with clavulanic acid</i> (Amoxicilina com ácido clavulânico)
Aminoacil-tRNA	Cadeia polipeptídica para o sítio A do ribossomo
AMO	<i>Amoxicillin</i> (Amoxicilina)
AMP	<i>Ampicillin</i> (Ampicilina)
Amp C	Ampicilinase C
AmpD	Gene repressor de beta-lactamase AmpC
AmpR	Gene regulador de beta-lactamase AmpC
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonam
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATPase	Enzimas que hidrolisam o grupo fosfato terminal do ATP
ATPe	<i>ATP Binding Cassette</i> - (superfamília cassete de ligação do ATP)
AUG	Códon de iniciação da tradução bacteriana
AZI	<i>Azithromycin</i> (Azitromicina)
β	Beta
BER	Bactéria Estocada da Rotina
BHI	Brain Heart Infusion
BIL	Gene BIL-1 de AmpC beta-lactamase
<i>bla</i>	Gene beta-lactamase
<i>bla</i> CMY	Gene beta-lactamase AmpC CMY (1-8)
<i>bla</i> CTX-M	Gene beta-lactamase espectro estendido CTX-M (1-25)
<i>bla</i> DHA	Gene beta-lactamase AmpC DHA (1-2)
<i>bla</i> FOX	Gene beta-lactamase AmpC FOX (1-5)
<i>bla</i> KPC	Gene <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
<i>bla</i> NDM	Gene New-Delli metalo-beta-lactamase
<i>bla</i> OXA	Gene oxacilinase-metalo-beta-lactamase
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CCCP	Cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFE	<i>Cephalexin</i> (Cefalexina)
CFL	<i>Cephalothin</i> (Cefalotina)
CFO	<i>Cefoxitin</i> (Cefoxitina)
CFZ	<i>Cefazolin</i> (Cefazolina)
CIP	<i>Ciprofloxacin</i> (Ciprofloxacina)
CLOR	<i>Chloramphenicol</i> (Cloranfenicol)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMY	Beta-lactamase AmpC CMY
CO ₂	Dióxido de carbono

COVID	<i>Corona virus disease</i> (SARS-CoV-2)
CPM	<i>Cefepime</i> (Cefepime)
CRE	<i>Carbapenem Resistant Enterobacterales</i> (Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos)
CRO	<i>Ceftriaxone</i> (Ceftriaxona)
CRX	<i>Cefuroxime</i> (Cefuroxima)
CTF	<i>Ceftiofur</i> (Ceftiofur)
CTX	Cefotaximase; Beta lactamase de espectro estendido CTX
CVN	<i>Cefovecin</i> (Cefovecina)
DHA	Beta-lactamase AmpC DHA
DHF	Di-hidrofolato
DHFR	Di-hidrofolato redutase
DHPS	Ácido di-hidropteróico sintase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	<i>Doxycycline</i> (Doxiciclina)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eCIM	<i>EDTA Carbapenem Inactivation Method</i> (Inativação de carbapenemase por EDTA)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EmrAB-TolC	Complexo de bomba de efluxo de <i>Escherichia coli</i>
ENO	<i>Enrofloxacin</i> (Enrofloxacina)
EPS	Estrutura poliméricas extracelulares
ESBL	Beta-Lactamase de espectro estendido
EuCast	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FADH2	<i>Flavin adenine dinucleotide</i> (Difosfato de flavina adenina)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura)
FLOR	<i>Florfenicol</i> (Florfenicol)
FOX	Beta-lactamase AmpC FOX
FW	<i>Foward</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GEN	<i>Gentamicin</i> (Gentamicina)
GIM	<i>German imipenemase</i>
IMI	Beta-lactamase hidrolisante de imipenem
IMP	Imipenem; <i>metallo-imipenemase</i> ; Imipenemase
Inch1	Plasmídeo que contém genes que codificam bombas de efluxo
INF	<i>Infinite</i>
KPC	Carbapenemase <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LAT	Beta lactamase AmpC LAT
LPS	Lipopolissacarídeos
LVX	<i>Levofloxacin</i> (Levofloxacina)
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MATE	<i>Multidrug And Toxic Compound Extrusion</i>
MBL	<i>Metallo-beta-lactamase</i>
mCIM	<i>Modified Carbapenem Inactivation Method</i> (inativação da carbapenemases modificado)
MDR	<i>Multidrug Resistant</i>
MdtABC	Sistemas de efluxo de moléculas antibacterianas MdtABC

mecA	Gene encontrado em células bacterianas que permite sejam resistentes a meticilina
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MexAB-OprM	Sistemas de efluxo de droga MexAB-OprM
MH	Ágar Mueller-Hinton
MHT	Modified Hodge Test
MIC	Concentração inibitória mínima
MIR	Beta lactamase AmpC MIR
MOX	Beta lactamase AmpC MOX
mPCR	Reação de cadeia polimerase multiplex
mRNA	RNA mensageiro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MRT	<i>Methyl red test</i>
MSF	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
N ₂	Gás dinitrogênio inerte
NAD ⁺	Forma oxidada da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDM-1	<i>New Delhi metallo-beta-lactamase</i>
NEO	<i>Neomycin</i> (Neomicina)
NO ₃ ⁻	Arginina Nitrato
NOR	<i>Norfloxacin</i> (Norfloxacin)
O ₂	Forma molecular do oxigênio
OH	Grupo hidroxila
OMSA	<i>World Organization for Animal Health</i>
OmpC	Porina caracterizada em <i>Escherichia coli</i>
OmpF	Porina caracterizada em <i>Escherichia coli</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OprD	Porina caracterizada em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
OqxAB	Sistema de bomba de efluxo
OR	<i>Odds Ratio</i> (razão de probabilidade)
OXA	Oxacilinase
P	Valor-p
PABA	Ácido paraminobenzóico
PAN-BR	Plano de Ação Nacional para a Prevenção e Controle da Resistência Antimicrobiana no âmbito da Abordagem da Saúde única
PBP	Proteínas de ligação à penicilina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDR	<i>Pan Drug Resistant</i>
Peptidil-tRNA	Cadeia polipeptídica para o sítio P do ribossomo
PEN	<i>Penicillin</i> (Penicilina)
PhoE	Porina caracterizada em <i>E. coli</i>
R	Resistente
RecA	Proteína de recombinação homóloga
RIF	<i>Rifampicin</i> (Rifamicina)
RNA	Ácido ribonucleico
RND	<i>Resistance-nodulation-division</i> (Bombas superfamília resistência-nodulação-divisão)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico

RV	<i>Reverse</i>
S	Sensível
SBL	Serina-beta-lactamases
Ser-Xaa-	Sequência de aminoácidos conservada em proteínas de ligação a
Xaa-Lys	penicilina
SHV	Sulfidril variável
SIM	<i>Seoul imipenemase</i>
SIMT	<i>Sulfide production, indole, motility test</i>
SME	Enzima <i>Serratia marcescens</i>
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i> (Pequena família de resistência a múltiplas drogas)
SO ₄ ²⁻	Sulfato
SPM	São Paulo metalo-beta-lactamase
SUT	<i>Sulfamethoxazole + trimethoprim</i> (Sulfametoxazol + trimetoprim)
T2S	Proteínas do tipo II sistemas de secreção
T4P	Proteínas pili tipo IV
TEM	Beta lactamase tipo TEM
TET	<i>Tetracycline</i> (Tetraciclina)
Tet(M)	Gene Tet(M) de resistência a tetraciclina
Tet(O)	Gene Tet(O) de resistência a tetraciclina
THF	Tetrahydrofolato
THM	Teste de Hodge Modificado
TOB	<i>Tobramycin</i> (Tobramicina)
ToIC	Proteína na membrana externa
tRNA	Ácido ribonucleico transportador
TSI	<i>Triple sugar iron</i> (Ferro triplo de açúcar)
UAA	Códon de parada da tradução bacteriana
UAG	Códon de parada da tradução bacteriana
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UGA	Códon de parada da tradução bacteriana
USA	<i>United States of America</i>
VIM	<i>Verona Integron-encoded metallo-beta-lactamase</i>
VPT	<i>Voges-Proskauer test</i>
XDR	<i>Extensively Drug Resistant</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Zn ²⁺	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Morfologia e Metabolismo Celular Bacteriano	18
2.2	Moléculas Antibacterianas.....	22
2.3	Antibioticoterapia na Medicina Veterinária.....	25
2.4	Mecanismos de Ação de Antibacterianos	27
2.4.1	Beta-lactâmicos	30
2.5	Resistência Bacteriana aos Antibacterianos.....	33
2.6	Mecanismos de Resistência Antibacteriana	35
2.6.1	Resistência Intrínseca	35
2.6.2	Alteração na Permeabilidade da Membrana	36
2.6.3	Bombas de Efluxo.....	37
2.6.4	Resistência Adquirida	39
2.6.5	Mutações.....	40
2.6.6	Proteção, Alteração e Desvio de Sítios Alvo	41
2.6.7	Transferência Horizontal de Genes	43
2.6.8	Modificação e Inativação das Moléculas Antimicrobianas por Enzimas	46
2.6.9	Resistência Por Biofilme	60
2.7	Deteção Fenotípica e Genotípica de Beta-lactamases	61
2.8	Beta-lactamases de Espectro Estendido no Mundo e Brasil.....	63
3	REFERÊNCIAS	65
4	HIPOTESE	90
5	OBJETIVOS	91
5.1	Objetivo Geral.....	91
5.2	Objetivos Específicos.....	91
6	ARTIGO.....	92
6.1	Resumo.....	92
6.2	Abstract.....	93
6.3	Introduction	94
6.4	Materials and Methods	95
6.4.1	<i>Sample collection</i>	95
6.4.2	<i>Antimicrobial Susceptibility Testing</i>	96
6.4.3	<i>Phenotypic Resistance Testing</i>	97
6.4.4	<i>Molecular analysis</i>	97
6.4.5	<i>DNA Purification and Sequencing</i>	98
6.4.6	<i>Statistical Analysis</i>	98
6.5	Results	99
6.5.1	<i>Frequency of isolates by host and bacterial species</i>	99
6.5.2	<i>Antibacterial resistance, Multidrug resistance (MDR) and Extensively drug-resistant (XDR)</i>	100
6.5.3	<i>Phenotypic tests</i>	106
6.5.4	<i>Genotypic tests and Sequencing</i>	107
6.5.5	<i>Comparison between resistance pattern, phenotypic and genotypic tests</i> ..	114
6.6	Discussion.....	115
6.7	Conclusion	121
6.8	References.....	121
6.9	Appendix	133
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	146

1 1 INTRODUÇÃO

2 A antibiose, interação biológica natural que se fundamenta na
3 secreção de substâncias por bactérias e fungos com efeito tóxico a outros
4 microrganismos, é estudada há centenas de anos. O emprego dessa estratégia para
5 tratamento foi reportado antes mesmo da descoberta da penicilina (Brunel, 1951), o
6 primeiro antibiótico descrito por Alexander Fleming, em 1928 (Fleming, 1929).

7 Entretanto, a partir da descoberta da penicilina houve uma revolução
8 no tratamento de doenças infecciosas bacterianas na medicina moderna. Os
9 antibióticos, que são fármacos com capacidade bacteriostática ou bactericidas
10 (Caneschi et al., 2023), foram considerados “drogas milagrosas” pela possibilidade de
11 tratamento de moléstias contagiosas em larga escala (Reygaert, 2018). Todavia,
12 simultaneamente ao surgimento dos agentes antibacterianos, a resistência
13 bacteriana, que é um processo natural e gradual, foi acelerada pelo uso da
14 antibioticoterapia em massa (Reygaert, 2018; Hutchings; Truman; Wilkison, 2019).

15 A resistência a antimicrobianos é atribuída a diferentes fatores,
16 inerente a particularidade das espécies bacterianas (intrínsecos) ou que são
17 adquiridos conforme as populações de bactérias se contactam (Munita; Arias, 2016).
18 Dentre todos os mecanismos, a resistência pela propagação de elementos genéticos
19 móveis, plasmídeos e transposons, são o principal foco da resistência antimicrobiana
20 atual pelo elevado potencial de disseminação. Genes codificadores de Beta-
21 lactamases do tipo espectro estendido (ESBL) e Ampicilinase C (AmpC), além de
22 carbapenemases, que conferem resistência a beta-lactâmicos, a classe de antibióticos
23 mais relevante na antibioticoterapia (Lima et al., 2020), têm potencial hidrolítico da
24 molécula antibacteriana e estão relacionados com falha terapêutica e com mortalidade
25 em hospitais de seres humanos e veterinários (Tooke et al., 2019).

26 Bactérias Gram-negativas, especialmente da família
27 *Enterobacteriaceae*, têm importância destacada pelo número de patógenos
28 nosocomiais com característica de resistirem à protocolos terapêuticos devido à
29 presença beta-lactamases (Abushaheen et al., 2020; Saha; Sakar, 2021). Dentre
30 essas, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. apresentam notável
31 resistência aos medicamentos, sendo causa comum de enfermidades que ocorrem na
32 medicina veterinária (Iredel; Brown; Tagg, 2016; Paitan, 2018; Wang et al., 2020).

33 A pressão seletiva devido ao uso de antibióticos na terapêutica

34 veterinária e na produção animal, utilizados como promotores de crescimento na
35 pecuária e avicultura por décadas (Prestinaci; Pezzotti; Pantosti, 2015; Tang et al.,
36 2017) além da interação próxima entre humanos e animais, favoreceu a dispersão de
37 microrganismos resistentes com capacidade de infecção interespécies (Caneschi et
38 al., 2023) e, conseqüentemente, a crise de resistência bacteriana a antibacterianos.
39 No Brasil, existem relatos de enzimas beta-lactamases nesses gêneros causando
40 infecções em animais de companhia (Ishii et al. 2011; Melo et al., 2018, Sellera et al.,
41 2018; 2020a; 2021; Sartori et al., 2019, 2020; Sfaciotte et al. 2021; Santos et al., 2021;
42 Salgado-Caxito et al., 2021; Da Silva et al, 2022, Silva et al., 2024) e produção
43 (Almeida et al., 2017; Sartori et al., 2017; Nobrega et al., 2021; Campos et al. 2022;
44 Sierra et al., 2023).

45 Apesar da resistência bacteriana a antimicrobianos ser um problema
46 de saúde pública mundial há anos, a formalização de um Plano de Ação Nacional para
47 a Prevenção e Controle da Resistência Antimicrobiana no âmbito da Abordagem da
48 Saúde Única (PAN-BR) tem menos de uma década. Criado em 2018, converge com
49 os objetivos definidos para combate da resistência entre a Organização Mundial de
50 Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
51 (FAO) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA).

52 Os esforços contra a resistência bacteriana a antimicrobianos são,
53 portanto, recentes e, por isso, se demandam estudos sobre a relação de bactérias não
54 sensíveis a antibacterianos no contexto de animal, no âmbito nacional e local
55 (Ayukekbong; Ntemgwa; Atabe, 2017), uma vez que há implicações sanitárias e
56 econômicas relacionadas, como comprometimento com o sucesso do tratamento,
57 recuperação mais crítica em procedimentos hospitalares invasivos, maior exposição
58 hospitalar e necessidade de cuidados intensivos g (Saha; Sakar, 2021).

59 Assim, o objetivo desse estudo é caracterizar a presença de beta-
60 lactamases e carbapenemases, que resultam em resistência a beta-lactâmicos, em
61 amostras das espécies de companhia canina, felina, equina e de produção, da espécie
62 bovina e de peixes, encaminhadas de atendimentos clínicos em hospitais veterinários
63 da região de Londrina e de unidades de produção animal. Busca-se, dessa forma,
64 demonstrar a incidência regional desses elementos de resistência e contribuir com
65 informações que possam ser usadas para escolha de tratamento clínico, métodos de
66 controle e profilaxia contra resistência bacteriana e tratamento de pacientes em
67 hospitais e no campo.

68 2 REVISÃO DE LITERATURA

69 2.1 MORFOLOGIA E METABOLISMO CELULAR BACTERIANO

70 Bactérias são microrganismos unicelulares, geralmente com diâmetro
71 entre 0,5 e 1,0 μm , em formas como cocos, bastonetes, espirais ou ainda filamentos
72 ramificados, com reprodução que ocorre geralmente de forma assexuada, por fissão
73 binária, resultando na formação de células bacterianas filhas geneticamente idênticas
74 a célula originária (Silhavy; Kahne; Walker, 2010).

75 Com base na coloração de Gram, podem ser divididas em Gram-
76 positivas e Gram-negativas, sendo as diferenças estruturais e fisiológicas. As
77 bactérias Gram-negativas têm membrana citoplasmática circundada por uma fina
78 parede celular de peptidoglicano, de uma ou duas camadas. A camada de
79 peptidoglicano, por sua vez, é circundada por uma membrana externa contendo
80 lipopolissacarídeo. O espaço periplasmático, local importante de ação de
81 antibacterianos, abrange o intermediário entre membrana externa e membrana
82 citoplasmática (Miller; Salama, 2018). As bactérias Gram-positivas não possuem
83 membrana externa, mas são cercadas por camadas de peptidoglicano muito mais
84 espessas do que as encontradas nas Gram-negativas. Passando por essas camadas
85 de peptidoglicano estão longos polímeros aniônicos, chamados ácidos teicóicos
86 (Silhavy; Kahne; Walker, 2010).

87 O peptidoglicano, ou mureína, é um polímero linear formado pela
88 conjugação das moléculas de N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina alternados
89 entre si. A ligação entre essas estruturas é uma ligação glicosídica tipo β -(1 \rightarrow 4), o
90 que significa que o carbono anomérico (carbono que tem ligação entre um grupo
91 hidroxila (-OH) e o oxigênio do grupo carbonila (C=O)) do N-acetilmurâmico se une ao
92 carbono 4 da N-acetilglucosamina por meio de uma ligação covalente β , com a
93 orientação do grupo glicosídico para baixo em relação ao plano do anel de açúcar.
94 Essa ligação é altamente importante para a estrutura e integridade da parede celular
95 bacteriana (Mihelic et al., 2017).

96 Somado, há cadeia lateral de aminoácidos de configuração L e D (a
97 parte N-acetilmurâmica está ligada a hastes pentapeptídicas ou tetrapeptídicas (l-
98 alanina–d-isoglutamina–l-lisina–d-alanina–[d-alanina]), que são altamente
99 conservadas nas populações bacterianas (Lima et al., 2020; Pandey; Cascella, 2023).

100 A parede celular fornece suporte estrutural e proteção do ambiente externo.
101 Considerado como um constituinte vital, confere estabilidade mecânica aos
102 microrganismos, e sua desestabilização leva a morte celular (Zeng; Lin, 2013; Pandey;
103 Cascella, 2023).

104 O DNA bacteriano está disperso no citoplasma celular, não envolto
105 por um núcleo verdadeiro. O genoma é composto principalmente por moléculas de
106 DNA de fita dupla, podendo ter a adição de elementos circulares de DNA, os
107 plasmídeos (genoma acessório) (Gupta; Gupta; Singh, 2017). Em geral, estima-se que
108 o tamanho do genoma de Gram-negativas seja entre de quatro a seis milhões de
109 nucleotídeos, o que permite a codificação de 3.000 a 4.000 genes (Gupta; Gupta;
110 Singh, 2017). *E. coli* e *Klebsiella* spp. por exemplo, apresentam cerca de 4,6 e 5,5
111 milhões de pares de base, respectivamente (Jin et al., 2015; Rafiq; Sam;
112 Vaidyanathan, 2016). Já Gram-positivas tendem a ter genomas menores.
113 *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, por exemplo, tem 2,2 e 2,8
114 milhões de pares de base, respectivamente (Brooks; Mias, 2018; Wang et al., 2012).

115 A replicação do DNA genômico bacteriano pode ser dividida em três
116 fases gerais: a iniciação, na qual a origem (termo das posições específicas nos
117 cromossomos) da replicação do DNA é desenrolada pela enzima DNA helicase,
118 formando uma estrutura chamada forquilha de replicação (Dewar; Walter, 2017).
119 Enzimas chamadas primases sintetizam pequenas cadeias de RNA conhecidas como
120 *primers*, que fornecem um ponto de partida para a síntese de novo DNA (Griep, 2001).
121 O alongamento da cadeia de DNA ocorre pelas enzimas DNA polimerase, que copiam
122 o cromossomo usando síntese semiconservativa de DNA (Cooper, 2000). Em
123 seguida, as lacunas entre os fragmentos de DNA recém-sintetizados são seladas pela
124 ação da DNA ligase, resultando em duas moléculas de DNA idênticas (Alberts et al.,
125 2002a). A terminação ocorre quando as forquilhas de replicação convergentes se
126 encontram. O início da replicação é regulado de tal forma que a duplicação do genoma
127 é limitada a um único ciclo por ciclo celular (Dewar; Walter, 2017).

128 A transcrição bacteriana começa quando a enzima RNA polimerase
129 se liga a região promotora do DNA, desenrolando uma pequena porção da dupla
130 hélice do DNA, formando uma bolha de transcrição. Isso expõe uma das fitas de DNA,
131 chamada fita molde, para a síntese de RNA mensageiro (mRNA). RNA polimerase
132 sintetiza a molécula de mRNA complementar à fita molde de DNA, adicionando
133 nucleotídeos à extremidade 3' do RNA em crescimento, lendo a fita molde de DNA e

134 pareando os nucleotídeos. Quando a RNA polimerase alcança uma sequência
135 específica de nucleotídeos no DNA (sinal de terminação), a transcrição termina e a
136 RNA polimerase se desprende do DNA (Alberts et al., 2002b). Em bactérias, os sinais
137 de terminação frequentemente envolvem sequências de nucleotídeos que formam
138 uma estrutura de *hairpin* no RNA transcrito, seguida por uma região rica em citosinas
139 no DNA (Chen; Morita; Gottesman, 2019).

140 Por fim, a tradução inicia com a montagem do complexo de iniciação
141 da tradução, que inclui o ribossomo bacteriano, o mRNA e o tRNA (RNA de
142 transferência) iniciador carregado com o aminoácido formil-metionina. O complexo de
143 iniciação se forma na região do mRNA chamada de códon de iniciação AUG,
144 precedido pela sequência de Shine-Dalgarno no mRNA das bactérias, região que
145 marca o início de cada sequência codificadora, localizado a cerca de oito bases do
146 codon de início, que permite que o ribossomo encontre o códon para iniciação de cada
147 gene (Gualerzi; Pon, 2015). Durante o alongamento, o ribossomo percorre o mRNA,
148 lendo cada códon em sequência com o tRNA trazendo o anticódon correspondente
149 carregado com o aminoácido adequado para a junção ribossômica. Com a formação
150 de cada ligação peptídica, ocorre a translocação: o ribossomo avança ao longo do
151 mRNA em direção ao seu extremo 3', trazendo o tRNA carregado com a cadeia
152 polipeptídica para o sítio P (peptidil-tRNA) e movendo o tRNA desacoplado para o sítio
153 E (Ermolenko; Noller, 2011). A tradução termina quando o ribossomo encontra um
154 códon de terminação (UAA, UAG ou UGA) no mRNA. Em vez de tRNAs, fatores de
155 liberação se ligam ao sítio A (aminoacil-tRNA) do ribossomo, levando à liberação da
156 cadeia polipeptídica e dos componentes do ribossomo (Alberts et al., 2002c).

157 Os plasmídeos não acomodam nenhum dos conjuntos de genes
158 essenciais necessários para a célula para crescimento básico e multiplicação, mas
159 servem como andaime no qual são montados arranjos de genes de resistência a
160 antibióticos, por transposição e mecanismos de recombinação específicos do local
161 (Bennett, 2008).

162 A maioria das bactérias se move através de flagelos, ou por
163 filamentos, por exemplo, *pili*. Os *pili* permitem que as bactérias se liguem umas às
164 outras ou às partículas em superfície. Além disso, os *pili* também estão envolvidos na
165 transferência de plasmídeos entre células bacterianas, tendo alto impacto na
166 disseminação de genes e resistência a antibacterianos (Silhavy; Kahne; Walker,
167 2010).

168 O metabolismo heterotrófico, que é a oxidação biológica de
169 compostos orgânicos ou inorgânicos mais simples para produzir ATP, permite a
170 utilização de diferentes vias metabólicas podem variar dependendo da espécie
171 bacteriana e ambiente onde está dispersa (Jurtshuk, 1996).

172 Dentre as vias principais metabólicas, a utilização de glicose, que é
173 quebrada em piruvato, produzindo ATP e NADH no processo, é conhecida como
174 respiração (Chaudhry; Varacallo 2023). O ciclo de Krebs, também conhecido como
175 ciclo do ácido tricarboxílico, é o processo oxidativo na respiração pelo qual o piruvato
176 é completamente descarboxilado (via acetil coenzima A), gerando NADH e FADH₂,
177 que são utilizados na fosforilação oxidativa para produzir ATP (Alabduladhem;
178 Bordoni, 2022). O ciclo do glioxilato, que ocorre em algumas bactérias, é uma
179 modificação do ciclo de Krebs. A acetil coenzima A atua diretamente a partir da
180 oxidação de ácidos graxos ou outros compostos lipídicos (Jimenez-Diaz; Caballero;
181 Segura, 2017). A via das pentoses-fosfato são destaque na produção de NADPH e
182 pentoses (como a ribose), que são necessárias para a síntese de ácidos nucleicos e
183 outras moléculas (Spaans et al., 2015).

184 A respiração anaeróbica é outro modo heterotrófico de metabolismo
185 no qual um composto específico diferente do O₂ serve como acceptor terminal de
186 elétrons. Esses compostos aceitadores incluem NO₃⁻, SO₄²⁻, fumarato e até CO₂ para
187 bactérias produtoras de metano (Jurtshuk, 1996). Outro processo anaeróbico de
188 metabolismo heterotrófico, a fermentação, utiliza um composto orgânico em vez de
189 oxigênio como acceptor terminal de elétrons (ou hidrogênio). Isso geralmente envolve
190 a conversão de piruvato em outros produtos, como ácido láctico, etanol ou ácido
191 acético, com a regeneração de coenzimas como NAD⁺ (Buckel, 2021).

192 O ciclo do nitrogênio é um sistema de reutilização em que diferentes
193 formas de nitrogênio, orgânicas e inorgânicas, são metabolizadas e compartilhadas
194 entre bactérias, plantas e animais. O intercâmbio entre gás dinitrogênio inerte (N₂) da
195 atmosfera e 'nitrogênio reativo' (compostos de nitrogênio que suportam ou são
196 produtos de celulares metabolismo e crescimento) é inteiramente controlado por
197 atividades microbianas (amonificação, mineralização, nitrificação, desnitrificação e
198 fixação de nitrogênio) (Stein; Klotz, 2016; Gupta; Gupta; Singh, 2016).

199 Por fim, algumas bactérias têm a capacidade de utilizar glutamato
200 para produção de GABA (ácido gama-aminobutírico), via glutamato descarboxilase
201 (Iorizzo; Paventi; Di Martino, 2024; Kang; Ho; Pack, 2013), que por sua vez é utilizado

202 como fonte de carbono ou nitrogênio para produção de energia ou intermediários
203 metabólicos além de estar envolvido na resposta ao estresse, funcionando como um
204 sinalizador para regular a expressão gênica e a adaptação a condições adversas (Cui
205 et al., 2020; Feehily; Karatzas, 2013). A síntese de GABA além de requerer glutamato,
206 utiliza CO₂ e um próton para produzir GABA na presença do cofator piridoxal 5'-fosfato
207 (Lin et al., 1996). Pelo consumo de prótons, a síntese de GABA tem sido proposta
208 como um dos principais mecanismos de resistência a ácidos em bactérias, auxiliando
209 inclusive, na homeostase bacteriana (Konstanti et al., 2024; Feehily; Karatzas, 2013).

210 Os alvos dos antibacterianos são focados em componentes da
211 morfologia bacteriana ou processos metabólicos específicos. Alvos estruturais, como
212 a parede e membrana celular, são alvo de beta-lactâmicos e polimixinas,
213 respectivamente. Já a interferência na síntese de proteínas bacterianas são alvos de
214 aminoglicosídeos, tetraciclina e macrolídeos. A síntese dos ácidos nucleicos são alvo
215 de antibacterianos como quinolonas e rifamicinas, que interferem na replicação e
216 transcrição do DNA bacteriano. Alvos no metabolismo celular, como a síntese do
217 folato, é método de ação de sulfonamidas. A respiração celular e produção de
218 energias das bactérias também é um alvo antibacteriano, como a estreptomicina, que
219 interfere com a fosforilação oxidativa (tópico 2.4).

220 2.2 MOLÉCULAS ANTIBACTERIANAS

221 Antibiótico é uma substância química produzida naturalmente por
222 microrganismos capazes de inibir o crescimento ou eliminar uma população de
223 bactérias sensíveis a ele (Waksman, 1947). As moléculas antibacterianas surgiram do
224 conjunto de compostos semissintéticos, que são produtos naturais estruturalmente
225 modificados, e de produtos sintéticos, moléculas que tratam infecções bacterianas em
226 baixas concentrações possuindo toxicidade máxima para um patógeno e mínima para
227 o hospedeiro (Bentley; Bennett, 2003; Tortora; Funke; Case, 2017; Pancu et al., 2021).
228 Entretanto, definições coexistentes na literatura se utilizam da denominação de
229 antibiótico para substâncias antibacterianas em geral (Bentley; Bennett, 2003). Neste
230 trabalho, seguiremos a nomenclatura de moléculas antibacterianas para compostos
231 naturais, semissintéticos e sintéticos.

232 Além de serem classificados de acordo com a natureza da fonte,
233 antibacterianos podem ser agrupados de acordo com sua estrutura química,

234 mecanismos de ação, efeitos farmacológicos e espectro de atividade (Pancu et al.,
235 2021).

236 O uso de microrganismos produtores de substâncias microbiostáticas
237 e microbicidas para prevenir doenças têm os primeiros registros datados em torno de
238 1550 a.C. (Hutchings; Truman; Wilkinson, 2019). As descrições de tratamentos bem-
239 sucedidos contra infecções, realizado pela administração de substâncias extraídas de
240 microrganismos são relatadas no Egito, China, Sérvia, Grécia e Roma antigos. Há
241 descrição de aplicação tópica de bolor de pão como tratamento para doenças de pele
242 (Gould, 2016) e detecção do uso de tetraciclinas em esqueletos humanos escavados
243 na Núbia e durante a ocupação romana do Egito (Bassett, 1980). *Bald's Leechbook*,
244 um livro anglo-saxão do século 10 que contém receituários e remédios para diferentes
245 enfermidades incluindo infecciosas, propõe estratégias para tratamento da infecção
246 causada por *Staphylococcus aureus* (Harrison et al., 2015).

247 Na história recente, John Parkinson em seu livro *Theatrum*
248 *Botanicum*, de 1640, também refere uso de substâncias derivadas de microrganismos
249 para tratamento de enfermidades (Gould, 2016). No século XIX, Robert Koch (Koch,
250 1890). Louis Pasteur (Cavaillon; Legout, 2022) juntamente com John Parkinson
251 estabeleceram associação entre espécies bacterianas, sua propagação em fômites,
252 animais e humanos, e a doença causada, o que permitiu a relação de causa e efeito
253 em moléstias infecciosas. Em 1870, John Scott Burdon-Sanderson descreveu como o
254 fluído de cultura coberto de mofo inibia o crescimento de bactérias, se referindo ao
255 fungo *Penicillium* spp. Um ano mais tarde, Joseph Lister, demonstrou que *Penicillium*
256 *glaucium* tinha um efeito antibacteriano em tecidos humanos infectados. Em 1888,
257 Ernest Duchesne relatou que *Penicillium notatum*, originário de mofo de sela de
258 cavalo, foi usado com sucesso para tratar com a febre tifoide induzida em porquinhos
259 da Índia (Gould, 2016). Cerca de 20 anos após postulados de Koch, a piocianase,
260 sobrenadante extraído do cultivo em lotes de *Pseudomonas aeruginosa* (nomeada na
261 época como *Bacillus pycyanus*), se torna o primeiro antibiótico descrito a ser usado
262 para tratar infecções humanas, nos primeiros anos do século XX (Emmerich; Low,
263 1899; Gould, 2016).

264 Nesse mesmo período, Paul Ehrlich, notou que alguns reagentes
265 usados em colorações para exames histológicos apresentavam efeito bactericida. Em
266 1909, publicou seus resultados sobre o que se considera o primeiro antibiótico
267 sintético descrito, o Salvarsan, uma pró-droga a base de arsênio, usada como

268 principal alternativa para o tratamento de sífilis (Strebhardt; Ullrich, 2008; Gelpi;
269 Gilberton; Tucker, 2015). Devido a elevada toxicidade, a busca por um agente mais
270 eficaz promoveu a gradativa substituição do Salvarsan pelo Protosil, um
271 antibacteriano da classe das sulfonamidas descrito por Gehard Domagk na década
272 de 30 (Otten, 1986), que foi a primeira classe antibacterianos de amplo espectro em
273 uso (Hutchings; Truman; Wilkinson, 2019).

274 A descoberta da penicilina, em 1928, por Alexander Fleming (Fleming,
275 1929), é um marco na conduta do tratamento de enfermidades, considerada um pilar
276 terapêutico de infecções bacterianas da era moderna. O trabalho de Fleming inaugura
277 a era de ouro no descobrimento e aperfeiçoamento de novas moléculas de antibióticos
278 (Gould, 2016; Hutchings; Truman; Wilkinson, 2019; Pancu et al., 2021).

279 Entre a publicação do trabalho de Fleming até a disponibilização da
280 substância como medicamento, foram decorridos cerca de 15 anos. Isso porque a
281 cepa isolada originalmente não produzia quantidade suficiente de substância
282 bactericida, a penicilina. Além da necessidade da transição do raciocínio laboratorial
283 em uma medicação que poderia ser amplamente disponibilizada, o que envolve o
284 processo de purificação e estabilização do princípio ativo (Aminov, 2010; Gaynes
285 2017; Lobanovska; Pilla, 2017). Entretanto, durante o período de testes clínicos, já
286 ocorreram os primeiros relatos de resistência de microrganismos a esse mesmo
287 antibiótico, antes mesmo da sua aprovação para uso em pacientes (Katz; Baltz, 2016).
288 Em 1945, o sucesso clínico da penicilina em pesquisas, o espectro de ação
289 amplificado e o alcance da produção em escala industrial motivou o seu uso em
290 grandes proporções (Projan; Shlaes, 2004).

291 As duas décadas seguintes, era de ouro de pesquisas sobre
292 antibióticos, foram marcadas pelo surgimento exponencial de diferentes antióticos de
293 origem natural, incluindo bactérias do solo, e de moléculas sintéticas. Exemplo de
294 antibacterianos que surgiram nesse período foram a vancomicina, a meticilina e as
295 primeiras classes de cefalosporinas (Gould, 2016).

296 Nessa época, a resistência aos antibacterianos se tornou notável, e
297 se fez necessário a associação destes a outras moléculas para combater este
298 obstáculo. Em 1976, foram descritos pela primeira vez os inibidores bacterianos de
299 beta-lactamases, considerado como precursores dos carbapenêmicos, que foram
300 lançados na década seguinte (1980), junto com mono lactâmicos, antibióticos de
301 última escolha para tratamento clínico (Ventola, 2015).

302 Marcando o fim da era de ouro no desenvolvimento de
303 antibacterianos, em meados da década de 1980 e 1990, o aumento do isolamento de
304 bactérias resistentes invocou o uso de antibacterianos mais antigos, como colistina e
305 cloranfenicol, foi reconsiderado, sendo usados de forma isolada ou em combinação
306 com moléculas mais recentes. Efeitos sinérgicos de cefalosporina combinado com
307 inibidor de beta-lactamase, como ceftolozane com tazobactam, ceftazidima com
308 avibactam e ceftazidima com sulbactam foram criados com finalidade de atividade
309 antibacteriana contra cepas Gram-negativas produtoras de carbapenemases (Zhanel
310 et al., 2014).

311 2.3 ANTIBIOTICOTERAPIA NA MEDICINA VETERINÁRIA

312 A maior parte das moléculas antimicrobianas usadas em animais são
313 as mesmas usadas na medicina humana, com diferença para aquelas que tem
314 elevado grau de toxicidade. Entretanto, por anos, o uso de antimicrobianos na
315 medicina veterinária foi baseado na experiência da medicina humana e em empirismo
316 pela falta de conhecimento sobre a farmacocinética das moléculas antibacterianas nas
317 diferentes espécies, o que levou ao uso indiscriminado das moléculas disponíveis
318 (Lees et al., 2021). Cerca de cinco décadas foram necessárias antes dos
319 medicamentos comuns, como a penicilina, fossem apresentados em dosagem
320 cientificamente determinada para uso animal, com base na compreensão quantitativa
321 da interação do medicamento com o microrganismo alvo (dosagem, parâmetros
322 farmacocinéticos, farmacodinâmicos e suscetibilidade *in vitro*) (Prescott, 2017).

323 Os primeiros relatos do uso de antibióticos usados em animais tinham
324 a finalidade de promotores de crescimento em animais de produção, o que foi
325 praticado desde 1930, com diferentes princípios ativos e sem construção técnica
326 científica sólida por farmacologistas e clínicos veterinários (Dibner; Richards, 2005).
327 Enquanto a eficácia da penicilina ainda era demonstrada em humanos, as
328 sulfonamidas já eram introduzidas na alimentação animal, devido a não restrições de
329 patentes e o baixo custo para o uso em campo (Prescott, 2017).

330 Além disso, até a década de 60, a transmissão vertical era
331 considerada a única forma conhecida de disseminação de resistência a
332 antibacterianos. Portanto, as recomendações quanto ao uso clínico de antibacterianos

333 se baseavam na crença de que a seleção de resistência em animais de produção era
334 apenas um problema local que desaparecia espontaneamente após a descontinuação
335 do tratamento com antibiótico, devido à competição natural entre as bactérias (Lees
336 et al., 2021). Esse fato suprimiu o desenvolvimento de planos de controle para o uso
337 de antibacterianos de forma justificada e de projetos de prevenção e controle da
338 propagação da resistência a antimicrobianos. Apenas em 1965, após mais de três
339 décadas da introdução de antibioticoterapia na produção animal, se considerou a
340 importância de obter informações sobre o uso de antibióticos na pecuária e a
341 implicação para a saúde humana e animal (Anderson; Datta, 1965).

342 Em 1980, as bactérias patogênicas multirresistentes se tornaram
343 disseminadas em todo o mundo (Dibner; Richards, 2005). Como uma das medidas de
344 combate e controle, em 1998, a OMS recomendou banir o uso de antibióticos de
345 moléculas significativas para a saúde humana usadas como promotor de crescimento
346 na produção animal. No mesmo ano, essa orientação foi fomentada pelo Ministério da
347 Agricultura e Pecuária (MAPA) no Brasil, proibindo o uso de cloranfenicol, penicilinas,
348 tetraciclina e sulfonamidas sistêmicas como aditivos promotores de crescimento no
349 país para qualquer espécie (Cardoso, 2019).

350 Quanto ao uso de antibacterianos na clínica veterinária, até os anos
351 de 1950 e 1960, havia relativamente poucos artigos de autoria clínica que abordavam
352 doenças infecciosas e tratamento de pequenos animais. Por isso, as questões sobre
353 duração do tratamento, além da dose eram pouco documentadas e tecnicizadas (Lees
354 et al., 2021). A farmacocinética de moléculas antibacterianas em cães e gatos, objeto
355 de estudo da medicina humana desde a segunda década de 1900, por exemplo, foi
356 descrita pela primeira vez em 1972 (Watson, 1972). Apenas em 1990 a indústria
357 farmacêutica veterinária passou a dar destaque a pesquisa voltada a animais de
358 companhia, aquém de produtos voltados para animais de produção (Shryock;
359 Richwine, 2010). Isso explica por que alguns protocolos de dosagem definidos
360 historicamente foram recentemente revisados e atualizados.

361 Hoje, existem muitas diretrizes para o uso racional de antibacterianos
362 e configurações de dose. Entretanto, ainda que estendendo a expectativa e qualidade
363 de vida dos animais de criação no campo ou em atendimento clínico, o uso de
364 antibióticos generalizado sem critério, levou ao desenvolvimento de resistência a
365 esses medicamentos (Martinez, 2014). Isso resultou em um ciclo contínuo de
366 descoberta, desenvolvimento e resistência a antibióticos, com novas moléculas sendo

367 investigadas para superar a resistência e novos mecanismos de resistência surgindo
368 em resposta (OMS, 2021). Além disso, a falta de conhecimento quanto a prevalência
369 da resistência bacteriana local impede a recomendação de um tratamento efetivo, com
370 seleção dos antibióticos mais adequados.

371 A estreita relação que existe entre humanos e animais, que está
372 enraizada no fato de que, apesar das diferenças nas espécies, ambos são organismos
373 complexos com processos biológicos semelhantes premedita que a resistência
374 bacteriana contra antimicrobianos em animais seja realidade na saúde humana.
375 Questões críticas de pressão de seleção resultantes da utilização de antibióticos em
376 animais, particularmente em espécies produtoras de alimentos, tem responsabilidades
377 notáveis quando relacionado ao conceito de saúde única (Caneschi et al., 2023).
378 Neste contexto, o veterinário desempenha um papel fundamental, sendo chamado a
379 avaliar cuidadosamente as consequências das suas decisões e tendo a
380 responsabilidade de educar todos os que administram antibacterianos aos animais
381 (por exemplo, criadores e proprietários de animais de estimação).

382 2.4 MECANISMOS DE AÇÃO DE ANTIBACTERIANOS

383 Os agentes antibacterianos têm como alvo especificamente as
384 funções microbianas vitais. Cada classe possui mecanismo de ação diverso, com
385 ação bacteriostática e/ou bactericida (Figura 1) (Tenover, 2006).

386 A inibição da síntese da parede celular é o mecanismo de ação de
387 beta-lactâmicos, que têm como alvo um componente dessa estrutura, o
388 peptidoglicano. Essa inibição tem foco na atividade catalítica das transpeptidases
389 bacterianas, as proteínas de ligação a penicilinas (PBPs). A atividade inibitória da PBP
390 por beta-lactâmicos é baseada nas semelhanças estruturais, geométricas e
391 estereoquímicas entre as ligações amida da penicilina e o substrato enzimático
392 (dipeptídeo D-Ala-D-Ala -2) (Lima et al., 2020) (tópico 2.4.1)

393 A inibição da síntese de proteínas é o mecanismo utilizado por
394 antibacterianos como as tetraciclina, aminoglicosídeos e macrolídeos. Tetraciclina
395 se ligam reversivelmente à subunidade 30s do ribossomo bacteriano, impedindo a
396 ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A, impedindo a elongação da cadeia polipeptídica
397 durante a síntese proteica. Essa molécula também pode interferir com o movimento
398 do ribossomo ao longo do mRNA, resultando na interrupção da tradução em proteínas

399 (Chukwudi et al., 2016).

400 Já aminoglicosídeos se ligam irreversivelmente a porção 30s do
401 ribossomo (Kotra; Haddad; Mobashery, 2000). Essas moléculas também se ligam no
402 sulco principal do 16S, local de decodificação do rRNA, alterando a cinética de
403 acomodação do tRNA. Isso reduz significativamente a taxa de dissociação de tRNA,
404 atrapalhando o reconhecimento códon-anticódon e o alongamento da cadeia de
405 aminoácidos (Tsai et al., 2013).

406 Os anfenicois se ligam a subunidade 50S do ribossomo,
407 reversivelmente, próximo ao sítio onde ocorre a ação do peptidil-transferase, também
408 inibindo a formação de ligações peptídicas. Cloranfenicol, por exemplo, exibe um
409 modo de ação específico, dificultando apenas a formação de ligações peptídicas
410 quando o ribossomo carrega um peptídeo nascente com alanina ou serina na
411 penúltima posição (Chen et al., 2021).

412 Os macrolídeos atuam no alongamento da proteína, mais
413 especificamente no túnel de saída do peptídeo, obstruindo a saída para o citoplasma.
414 Tem papel como moduladores da tradução, uma vez que sua ação depende
415 criticamente da sequência proteica nascente e da estrutura do antibiótico (Vasqués-
416 Laslop; Mankin, 2018).

417 A ação principal das quinolonas e fluoroquinolonas é inibir enzimas
418 bacterianas chamadas DNA girase (topoisomerase II) e topoisomerase IV. Essas
419 enzimas desempenham um papel na replicação, transcrição e reparo do DNA
420 bacteriano. A DNA girase é responsável por induzir a superenrolamento negativo no
421 DNA durante a replicação, enquanto a topoisomerase IV é essencial para separar os
422 cromossomos replicados durante a divisão celular (Hooper; Jacoby, 2016). A ligação
423 dessa molécula às enzimas forma um complexo de DNA-quinolona-enzima,
424 impedindo a quebra e religação do DNA durante os processos de replicação e divisão
425 celular, impedindo a replicação e a transcrição do DNA bacteriano (Bush et al., 2020).

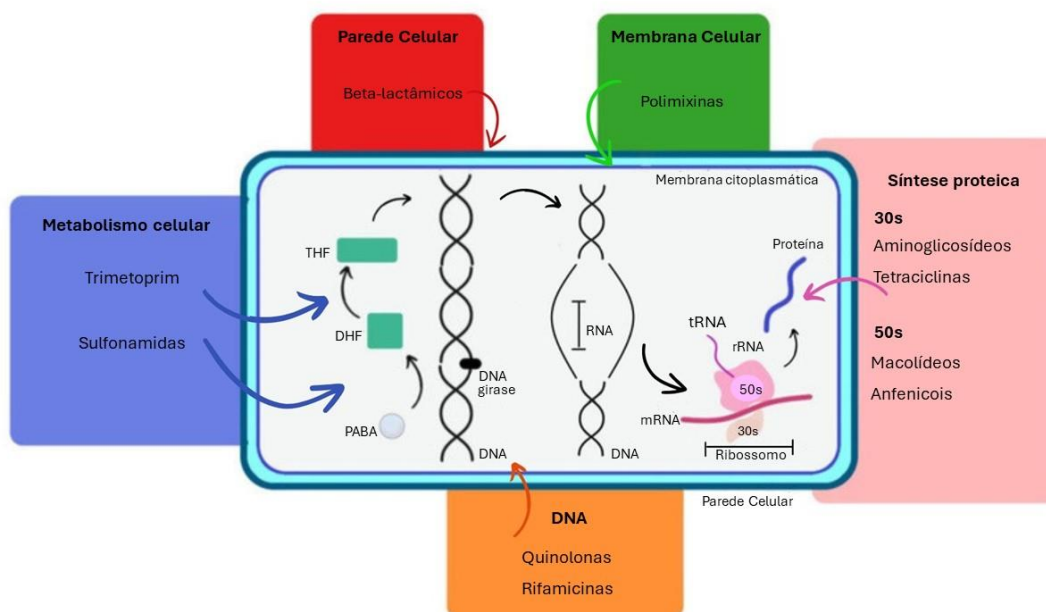
426 O principal alvo das rifamicinas é a RNA polimerase bacteriana. Essa
427 molécula se liga de forma específica e reversível à subunidade beta da RNA
428 polimerase, impedindo que a enzima se acople ao substrato, o DNA, para iniciar o
429 processo de transcrição, interrompendo a síntese de RNA (Campbell et al., 2001).

430 As polimixinas tem resultados associados a tratamento de Gram-
431 negativas. Isso porque são moléculas anfifílicas. Essa característica estrutural permite
432 que elas se associem com a camada lipídica da membrana externa celular bacteriana,

433 perturbando sua estrutura o que leva a mudanças na permeabilidade da membrana
434 celular, resultando em vazamento de íons e moléculas essenciais do interior da célula
435 bacteriana (Moubareck, 2020).

436 O ácido fólico é uma vitamina B essencial necessário para a síntese
437 de precursores de DNA e RNA (Abushaheena et al., 2020). O Trimetoprim e
438 sulfametoxazol atuam em estágios diferentes da via de síntese do ácido fólico, de
439 forma sinérgica. Trimetoprim inibe a diidrofolato redutase bacteriana, uma enzima que
440 converte o ácido diidrofólico em tetraidrofolato ativo, que é necessário para a síntese
441 de purinas e pirimidinas. Enquanto isso, o sulfametoxazol compete com o
442 paraminobenzóico (PABA), precursor do ácido fólico, impedindo a formação de ácido
443 diidrofólico (Minato et al., 2018).

Figura 1 – Alvos de ação de diferentes classes de antibacterianos.



DNA: ácido desoxirribonucleico; **DNA girase:** enzima topoisomerase do tipo II; **DHF:** Dihidrofolato; **PABA:** ácido paraminobenzóico; **RNA:** Ácido ribonucleico; **mRNA:** ácido ribonucleico mensageiro; **rRNA:** ácido ribonucleico ribossômico; **THF:** Tetrahydrofolato; **tRNA:** ácido ribonucleico transportador. **Fonte:** a autora (adaptada de Mota et al., 2010).

444 2.4.1 Beta-lactâmicos

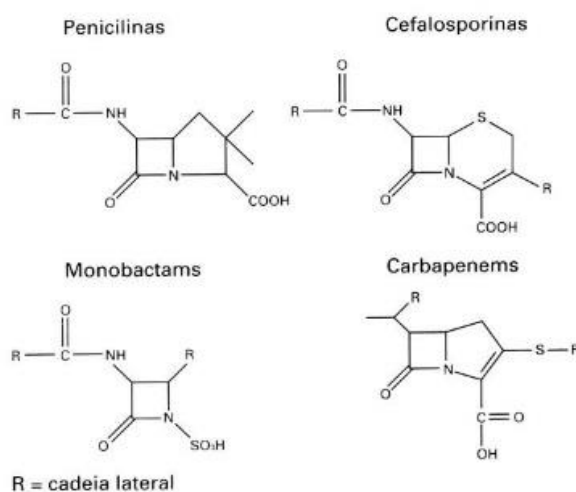
445 Os antibióticos da classe beta-lactâmicos são agentes com
 446 capacidade bactericida. Representando cerca de dois terços dos antibióticos usados
 447 para terapia antimicrobiana global, são os mais frequentemente prescritos no
 448 tratamento de infecções bacterianas na medicina veterinária (Bush; Bradford, 2020) e
 449 representam a classe de antibióticos mais importante em termos de lucros
 450 farmacêuticos (Tooke et al., 2019).

451 Esses antibióticos visam a interrupção e a desestabilização da
 452 síntese da parede celular, inibindo sua formação ou remodelação, o que leva a sua
 453 desestabilização e eventual morte bacteriana por enfraquecer a parede e ocasionar
 454 lise celular. Nessa classe, estão inclusas as penicilinas, cefalosporinas de 1°, 2°, 3°,
 455 4° e 5° geração, monobactâmicos e carbapenêmicos (Yan; Li; Li, 2020). Do ponto de
 456 vista bioquímico, essas moléculas têm uma característica comum, que é o anel de três
 457 carbonos e um nitrogênio (anel beta-lactâmico) altamente reativo (Lima et al., 2020).

458 Penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos são estruturas
 459 bicíclicas. Nas penicilinas, o anel beta-lactâmico de quatro membros está fundido a
 460 um anel tiazolidínico. Já nas cefalosporinas, o parceiro de fusão é uma diidrotiazina

461 de seis membros e nos carbapenêmicos, o sistema é completo por uma pirolina de
 462 cinco membros. A quarta classe, os monobactâmicos são sistemas monocíclicos
 463 (Tooke et al., 2019) (Figura 2).

Figura 2 – Estrutura química dos compostos das quatro subclasses de Beta-lactâmicos.



Fonte: Williams, 1999.

464 Os antibióticos beta-lactâmicos se ligam e inibem a atividade de
 465 enzimas PBPs, que desempenham um papel fundamental na síntese da parede
 466 celular bacteriana. As PBPs são enzimas envolvidas nas etapas de estabilização entre
 467 as camadas lineares do peptidoglicano a partir das ligações peptídicas (reticulação).
 468 Elas possuem atividade D,D-carboxipeptidase (D-Ala-D-Ala) ou endopeptidase para
 469 hidrolisar a ligação peptídica que conecta duas cadeias de peptidoglicano (Goffin;
 470 Ghuysen, 1998; Sauvage et al., 2008; Lau et al., 2020).

471 Beta-lactâmicos inibem a última etapa da síntese do peptidoglicano,
 472 a transpeptidação, ação realizada pela ação da enzima transpeptidase (Lima et al.,
 473 2020). A transpeptidase é uma enzima que sintetiza a ligação em duas cadeias laterais
 474 de polímeros que estão paralelas entre si, e são chamadas de PBPs, uma vez que
 475 foram identificadas pela primeira vez como as moléculas alvo para ação da penicilina
 476 (Sauvage; Terrak, 2016).

477 Uma vez que ocorre o reconhecimento quimiosseletivo dos PBPs pelos
 478 antibióticos beta-lactâmicos e a ocupação do seu sítio ativo, a ligação entre peptídeos
 479 é interrompida, prejudicando a desacetilação, reação catalisada pela transpeptidase.
 480 Dessa forma, ocorre o a inibição do processo de transpeptidação, gerando processos

481 autolíticos concomitantes dentro da célula bacteriana (Pandey; Cascella, 2023).
482 Existem semelhanças químicas entre substratos utilizados pelas PBPs e os
483 compostos beta-lactâmicos. Sendo assim, esta classe de antibióticos se liga
484 irreversivelmente ao sítio catalítico da enzima, mediada pela adição nucleofílica do
485 resíduo de serina presente no sítio ativo à unidade carbonila do beta-lactâmico (Lima
486 et al., 2020), e extingue a síntese do peptidoglicano mediado por PBP, o que
487 desestabiliza a parede e resulta em morte celular (Sauvage et al., 2008; Sauvage;
488 Terrak, 2016).

489 As PBPs podem ser divididos em classes de acordo com a massa
490 molecular. PBPs de baixa massa molecular podem ser classificados em A, B e C,
491 sendo a maior parte de PBPs dessa categoria seja se classe C. Os PBPs de alta
492 massa molecular têm arquitetura modular e domínio de transpeptidase C-terminal, e
493 foram divididas em duas subclasses. A classe A inclui enzimas bifuncionais com uma
494 transpeptidase e um domínio transglicosilase (catalisam a polimerização da cadeia de
495 glicano), e têm atribuição de catalisar a transpeptidação (catalisam a ligação cruzada
496 entre as cadeias de glicano) quando há domínio N-terminal com atividade de
497 transpeptidase. A classe B engloba as transpeptidases dependentes de D-Ala-D-Ala
498 (Goffin; Ghuysen, 1998) e apresentam função de transpeptidase (Sauvage et al.,
499 2008; Straume et al., 2020).

500 Pelo menos uma PBP é considerada essencial em cada espécie
501 bacteriana, com especificidade única para ligação com beta-lactâmicos, mas que varia
502 entre cada espécie. Em Gram-negativas, os PBPs essenciais incluem os PBPs de alto
503 peso molecular 1a e 1b, PBP2 e PBP3, que estão envolvidos na interrupção da divisão
504 e lise celular (Bush; Bradford, 2016).

505 É importante salientar que, para que o antibiótico apresente atividade
506 em bactérias Gram-negativas, deve ter acesso ao espaço periplasmático, onde está
507 localizado o peptidoglicano. Para isso, deve passar a camada antigênica da bactéria,
508 o lipopolissacarídeo (LPS), e a membrana externa por meio das proteínas
509 transmembrânicas (porinas) que atuam como canais para a passagem de pequenas
510 moléculas hidrofílicas. Portanto, antibióticos com característica hidrofílica, como
511 amoxicilina, apresentam maior facilidade de passagem por esses canais, e por isso
512 apresentam amplo espectro de ação. Embora outros beta-lactâmicos sejam solúveis
513 em água, alguns apresentam solubilidade menor que os demais, o que dificulta sua
514 ação (Sharma; Gupta; Pathania, 2019). Além disso, os efeitos de beta-lactâmicos em

515 Gram-positivas são mais abrangentes, uma vez que possuem camadas abundantes
516 de peptidoglicano, e conseqüentemente, maior quantidade de sítio ativo de PBPs
517 disponíveis para ligação do antibiótico.

518 No geral, a inibição da síntese da parede celular é um mecanismo de
519 ação eficaz no tratamento de infecções bacterianas, mas a resistência em Gram-
520 negativos, intrínseca ou por transferência horizontal de genes de resistência, é uma
521 grande preocupação para saúde única, destacando a importância da pesquisa e
522 desenvolvimento de novos antibióticos continuamente, ou de novas opções
523 terapêuticas (Munita; Arias, 2016).

524 2.5 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBACTERIANOS

525 Atualmente, doenças causadas por agentes bacterianos resistentes a
526 tratamento foram a causa direta de óbito de 1,27 milhões de pessoas e contribuíram
527 para 4,95 milhões de mortes no mundo, só no ano de 2019 (OMS, 2023), devido a
528 ineficiência de ação terapêutica contra microrganismos ou da profilaxia ineficientes
529 contra procedimentos invasivos (Martinez, 2014).

530 A resistência bacteriana pode ser definida como sobrevivência de
531 uma bactéria exposta a tratamentos que poderiam eliminá-la, conservando a
532 habilidade de replicação (Balaban et al., 2019). A seleção de bactérias resistentes
533 pelo uso indiscriminado é a causa majoritária do aumento da insensibilidade a
534 antibacterianos e, estando presente em todas as esferas de saúde, é compreendido
535 que é um problema emergente de saúde única (PAHO, 2023) que abrange bactérias
536 comensais e patogênicas (Abushaheena et al., 2020; Frieri; Kumar; Boutin, 2017).

537 Bactérias patogênicas podem ser parcialmente afetadas ou não sofrer
538 impacto dependendo da exposição protocolo de tratamento (completo ou não) ou
539 ainda o uso da dosagem correta, pureza da molécula, validade e armazenamento da
540 droga. Esse tipo de pressão ambiental pode engatilhar a expressão de mecanismos
541 de resistência (intrínsecos ou adquiridos) que selecionam essas cepas
542 multirresistentes (Nikaido, 2009).

543 Bactérias usualmente encontradas em ambientes hospitalares são as
544 principais afetadas pela seleção que leva a resistência, local onde a transferência de
545 genes de resistência é favorecida pela coabitação de microrganismos patogênicos e
546 o uso de antibióticos é recorrente (Witte, 1998). Entretanto, instalações de animais de

547 produção também favorecem o cultivo natural de bactérias com potencial de
548 resistência.

549 A resistência aos antibióticos pode ocorrer através de vários
550 mecanismos. Os mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos se referem as
551 formas pelas quais as bactérias podem escapar ou neutralizar os efeitos dos
552 antibióticos e outros agentes antimicrobianos (Saha; Sarkar, 2021), podendo ser
553 intrínsecos, isto é, inerentes ao microrganismo, ou adquiridos, por transdução,
554 conjugação ou transformação.

555 Os mecanismos de resistência bacteriana são classificados de acordo
556 com a ação e incluem bombas de efluxo, alteração de permeabilidade de membrana,
557 degradação da molécula antimicrobiana, modificação do sítio alvo, transferência de
558 genes, ou ainda, causadas por mutações gênicas aleatórias (Darby et al., 2022).
559 Também há a formação de estruturas complexas que tem como função proteção da
560 célula bacteriana e que atrapalham a ação de drogas terapêuticas, como detecção
561 por *quorum sense* e o biofilme (Munita; Arias, 2016).

562 De acordo com a OMS, 75% dos patógenos prioritários resistentes a
563 antibióticos que representam uma grande ameaça e para os quais novas moléculas
564 são urgentemente necessárias são patógenos bacterianos Gram-negativos (OMS,
565 2019). No geral, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes aos efeitos de
566 moléculas antibacterianas do que as bactérias Gram-positivas (Breijyeh; Jubeh;
567 Karaman, 2020). Isso se deve a diferença da disposição da parede celular, a
568 hidrofobicidade da membrana externa (Savage, 2001; Baumgarten et al., 2012), o
569 potencial de carga da membrana (Benarroch; Assaly; 2020) e a necessidade de
570 chegar ao espaço periplasmático para algumas classes de antibióticos exercerem sua
571 função (Livermore, 1995).

572 Atualmente, aproximadamente 48.000 plasmídeos contendo genes
573 de resistência a antibióticos foram identificados em Gram-positivas e Gram-negativas
574 (CARD, 2023). Entre Gram-negativos, a resistência está principalmente relacionada à
575 produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), ampicilinase C beta-
576 lactamases (AmpC) e carbapenemases, enzimas capazes de hidrolisar o anel beta-
577 lactâmico de beta-lactâmicos, por exemplo (Paterson, 2006).

578 O debate central, efetivamente, não tem foco único no potencial de
579 transferência de bactérias resistentes a antibacterianos entre animais e humanos, mas
580 sim a magnitude da contribuição para o nível geral de resistência antimicrobiana em

581 humanos resultante do uso de antibióticos em animais. Embora exista autor que
582 defenda a ideia de que a contribuição dos animais para o problema geral da
583 resistência humana a antibacterianos provavelmente é de pouca importância
584 (Bywater, 2004), outros sugerem que a medicina veterinária é o principal fator
585 responsável pela resistência antimicrobiana em humanos (Richez; Burch, 2016;
586 Wallinga; Burch, 2013) e, portanto, ponto chave no equilíbrio para a saúde única.

587 2.6 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA

588 2.6.1 Resistência Intrínseca

589 A resistência intrínseca de uma espécie bacteriana a determinado
590 antibacteriano é definida como a capacidade de resistir à ação dessa droga devido a
591 características estruturais ou funcionais inerentes desse microrganismo (Blair;
592 Richmond; Piddock, 2014), e é um fator importante no tratamento de doenças
593 bacterianas.

594 É um mecanismo evolutivamente antigo, identificada em bactérias
595 patogênicas e em ambientais, comum a todas as cepas de uma espécie bacteriana,
596 que não foi adquirida como resultado da recente utilização de antibióticos para terapia
597 (D'Costa et al., 2006; Fajardo et al., 2008), e não relacionada à transferência horizontal
598 de genes (Reygaert, 2018; Fajardo et al., 2008).

599 A resistência intrínseca pode ser atribuída a diversos fatores, como
600 diferenças na estrutura da parede celular, bombas de efluxo ativas, redução da
601 permeabilidade da membrana (Nikaido, 2001), ou uma complexa rede de *loci*
602 genéticos que contribuem para essa característica (Cox; Wright, 2013). Além disso, a
603 suscetibilidade aos antibióticos também é dependente do estado metabólico da
604 bactéria e da sua fisiologia (Hogan; Kolter, 2002; Wiuff et al., 2005).

605 Diferentemente da resistência por mutações, a resistência intrínseca
606 é originada principalmente em ambientes de menor pressão seletiva de
607 antibacterianos, como ambientes não hospitalares. Isso sugere que o fenótipo de não
608 conferir resistência no *habitat* natural é o principal papel fisiológico das cepas
609 envolvidas (Fajardo et al., 2008).

610 Exemplos de resistência intrínseca a moléculas antibacterianas são a
611 incapacidade de alguns agentes de atravessar a membrana bacteriana externa pela

612 redução de a permeabilidade (Blair et al., 2015; Blair; Richmond; Piddock, 2014) e a
613 atividade natural das bombas de efluxo, (embora bombas de efluxo de múltiplas
614 antibacterianos também são um mecanismo comum de resistência induzida) (Cox;
615 Wright, 2013; Fajardo et al., 2008). Por esses mecanismos, há resistência intrínseca
616 de Gram-negativos a glicopeptídeos e lipopeptídeos, como *E. coli* a macrolídeos,
617 *Klebsiella* spp. a ampicilina e Gram-positivos a aztreonam (Reygaert, 2018).

618 2.6.2 Alteração na Permeabilidade da Membrana

619 A membrana externa em Gram-negativas atua como a primeira linha
620 de defesa contra a penetração de vários compostos tóxicos as bactérias. Os canais
621 de difusão entre a bicamada lipídica da membrana celular externa, as porinas,
622 funcionam como passagem que permitem o transporte de moléculas para dentro e
623 para fora da célula (Nikaido, 2003). A alteração da permeabilidade de membrana pela
624 modificação de porinas é um mecanismo notável em bactérias Gram-negativas, uma
625 vez que limita a entrada de antibacterianos do meio externo para o ambiente
626 intracelular (Munita; Arias, 2016).

627 As bactérias Gram-negativas têm diferentes tipos de porinas
628 caracterizadas de acordo com sua atividade (específicas ou seletivas), sua função
629 estrutural (monomérica ou trimérica) e sua regulação e expressão (Pages; James;
630 Winterhalter, 2008). Entre as porinas mais bem caracterizadas estão as três principais
631 produzidas por *E. coli*, OmpF, OmpC e PhoE, conhecidas como porinas clássicas e a
632 OprD, porina da *Pseudomonas aeruginosa* (Munita; Arias, 2016; Nikaido, 2003).

633 As bactérias têm alteração de permeabilidade de membrana, e,
634 consequentemente de porinas, através de vários mecanismos. A capacidade de
635 regular geneticamente de forma negativa porinas é observado de forma frequente em
636 *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *K. pneumoniae* (Delcour, 2009). Mutações em
637 genes que codificam porinas ou aquisição de genes de resistência relacionados a elas
638 resultam em modificações a sua estrutura tridimensional, em perda parcial ou total de
639 função de porinas específicas, e na interrupção da produção de novas porinas (Ghai;
640 2023; Saha; Sarkar, 2021; Delcour, 2009).

641 Exemplo de resistência intrínseca pela baixa penetração via porinas
642 é a vancomicina e sua ineficiência contra bactérias Gram-negativas, que não
643 consegue acessar seu alvo (precursor de peptídeoglicano) pela incapacidade de

644 ultrapassar a membrana externa presente nessas células (Van Groesen et al., 2021).
645 Níveis reduzidos de expressão de porinas e produção de beta-lactamases foram os
646 principais mecanismos de resistência a beta-lactâmicos relatados em isolados de *K.*
647 *pneumoniae*, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter baumannii* (Tu et al., 2023; Pachori;
648 Gothwal; Gandhi, 2019; Pages et al., 2009; Pages; James; Winterhalter, 2008).

649 2.6.3 Bombas de Efluxo

650 As bombas de efluxo são compostas por proteínas transmembrana
651 que atravessam a membrana celular e podem bombear uma grande variedade de
652 substâncias, como antibacterianos, compostos tóxicos e outras moléculas com
653 potencial nocivo para fora da bactéria. Ao bombear os antibacterianos antes que eles
654 cheguem ao local de destino, as bombas de efluxo reduzem a concentração desses
655 agentes dentro da célula e protegem as bactérias de seus efeitos (Nikaido, 2001;
656 Nikaido; Pages, 2012). Uma das primeiras descrições de um sistema de efluxo capaz
657 de bombear antibacteriano para fora do citoplasma ocorreu nos primeiros anos de
658 1980, descrevendo a evasão do efeito da tetraciclina em *E. coli* por esse mecanismo
659 (McMurry; Petrucci; Levy, 1980).

660 Os genes que codificam bombas de efluxo podem ser cromossomais
661 ou estar localizados em elementos genéticos móveis (Reygaert, 2018). Bombas
662 codificadas em cromossomos podem explicar a resistência intrínseca de algumas
663 espécies bacterianas a um determinado antibacteriano (Reygaert, 2018). Já os genes
664 que codificam bombas superfamília resistência-nodulação-divisão (RND), por
665 exemplo, foram descritos um plasmídeo (IncH1), isolado de uma cepa de *Citrobacter*
666 *freundii* (Dolejska et al., 2013).

667 A expressão de bombas de resistência pode ser regulada por
668 diferentes mecanismos, incluindo alterações no nível de expressão ou alterações na
669 regulação das bombas (Peterson; Kaur; 2018). Por exemplo, podem ser expressas
670 constitutivamente ou ser induzidas a super expressão, sob certos estímulos
671 ambientais ou quando um substrato adequado está presente (Reygaert, 2018).
672 Quando super expressas, geralmente por meio de uma mutação que modifica o canal
673 de transporte, também podem conferir altos níveis de resistência a antibacterianos
674 que antes apresentavam a característica de sensibilidade. Essas mutações podem
675 estar dentro de um local repressor, um fator de transcrição global ou em sítios

676 intergênicos que alteram a expressão dos genes da bomba ou seus reguladores (Blair;
677 Richmond; Piddock, 2014).

678 As bombas podem ser ainda específicas para substrato, por exemplo,
679 um determinado antibacteriano, ou com ampla especificidade de alvos (que afetam
680 diferentes classes), que geralmente são encontrados em bactérias multirresistentes e
681 são conhecidas como bombas de efluxo de resistência múltipla (Poole, 2005; Blair;
682 Richmond; Piddock, 2014).

683 Os sistemas de bombas de efluxo capazes de expulsar
684 antibacterianos e outras moléculas com potencial prejudicial para bactérias são
685 categorizados em cinco classes. A superfamília facilitadora (*Major Facilitator*
686 *Superfamily - MSF*), a superfamília cassete de ligação do ATP (*ATPe - Binding*
687 *Cassette - ABC*), a superfamília resistência-nodulação-divisão (*resistance-nodulation-*
688 *division - RND*), a pequena família de resistência a múltiplas drogas (*Small Multidrug*
689 *Resistance - SMR*), e a família de extrusão de compostos tóxicos e multidrogas
690 (*Multidrug And Toxic compound Extrusion - MATE*) (Blair et al., 2015).

691 Segundo Blair et al. (2015), essas famílias também podem ser
692 divididas em grupos chamados de transportadores primários e secundários. Bombas
693 da família ABC são membros do primeiro grupo e usam a energia de ligação de ATP
694 e hidrólise para efluxo. Bombas dos grupos MSF, RND, SMR e MATE, classificadas
695 como de transportadores secundários, usam energia do potencial eletroquímico da
696 membrana para atividade de efluxo.

697 Embora não sejam exclusivas de bactérias Gram-negativas, as
698 bombas da família RND são mais comumente encontradas em tais bactérias e
699 normalmente operam em sistema tripartido, que abrange uma proteína de membrana
700 plasmática, uma proteína de fusão de membrana e um fator de membrana externa,
701 que comunica seletivamente o citoplasma com o ambiente externo (Moreira; Souza;
702 Moraes, 2004; Poole, 2005; Fernando; Kumar, 2013).

703 Entre várias espécies, os sistemas RND de bomba de efluxo são
704 altamente conservados e a genômica comparativa apresenta altos níveis de
705 identidade entre as principais Gram-negativas de potencial clínico, como *E. coli*,
706 *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (Piddock, 2006;
707 Blair et al., 2015). Sua super expressão confere níveis intrínsecos de resistência a
708 beta-lactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprima, sulfametoxazol e
709 norfloxacin (Munita; Arias, 2016). O sistema RND mais bem caracterizado na *E. coli*

710 é o AcrAB-TolC que, como outras bombas desta família, é composta por um
711 transportador de membrana interna (AcrB), um canal de proteína na membrana
712 externa (TolC) e uma proteína adaptadora periplasmática (AcrA) (Alenazy, 2022; Du
713 et al., 2014; Piddock, 2006).

714 Existem vários sistemas de bombas de efluxo que contribuem para a
715 resistência das bactérias contra os beta-lactâmicos (Al-Dahmoshi; Ali-Khafaji, 2022).
716 Além do AcrAB-TolC, que tem capacidade de expulsão de beta-lactâmicos e outras
717 classes de antibacterianos e são encontradas em diversas espécies de Gram-
718 negativas (Sharma; Gupta; Pathania, 2019; Rajapaksha et al., 2021), EmrAB-TolC,
719 MdtABC e OqxAB também são sistemas de bomba de efluxo presentes em *E. coli* e
720 *K. pneumoniae* (Al-Dahmoshi; Ali-Khafaji, 2022; Bharatham et al., 2021; Nagakubo et
721 al., 2002; Ni et al., 2020).

722 Inibidores da bomba de efluxo são compostos que podem bloquear
723 ou inibir a atividade dessas estruturas, permitindo que os antibacterianos permaneçam
724 dentro do microrganismo e exerçam seus efeitos terapêuticos. Combinando esses
725 inibidores com beta-lactâmicos, é possível aumentar a eficácia desses antibacterianos
726 contra bactérias resistentes (Sharma; Gupta; Pathania, 2019). Exemplos desses
727 compostos são a Ampicilina/Sulbactam + Fenilalanina-Arginina Beta-Naftilamida
728 (PAβN), Cefepime + Verapamil e Meropenem + Cianeto de carbonila 3-
729 clorofenilhidrazona (CCCP) (Chawla et al., 2022).

730 2.6.4 Resistência Adquirida

731 A expressão resistência adquirida normalmente se refere a
732 capacidade de resistência a moléculas antibacterianas obtidas em uma população
733 bacteriana que, em algum momento foi originalmente suscetível, mas que perdeu essa
734 característica devido a diferentes mecanismos. As bactérias usam duas grandes
735 estratégias genéticas para se adaptar a ação do antibacteriano: aquisição de DNA
736 externo codificador de determinantes de resistência através da transferência
737 horizontal de genes, obtidos originalmente de organismos intrinsecamente resistentes
738 presentes no ambiente e as mutações em genes frequentemente associados ao
739 mecanismo de ação da droga (Munita; Arias, 2016).

740 As mutações genéticas podem conferir características diferentes em
741 relação aos alvos com alta afinidade, impedindo a atividade normal do antibacteriano.

742 Modificações diretas de antibacterianos por inativação por hidrólise ou por
743 transferência de uma estrutura química da molécula, podem ser resultantes de ações
744 de enzimas codificadas em genes transferidos entre microrganismos (Blair et al.,
745 2015).

746 Enquanto a resistência intrínseca pode fazer uso da estratégia de
747 captação limitante e efluxo de moléculas, os mecanismos de resistência adquiridos
748 podem estar ligados a modificação do alvo, a inativação da droga e ao seu efluxo
749 (Reygaert, 2018), caso adquirida de um DNA exógeno, e por isso, a origem, fonte,
750 mobilização e fatores moleculares envolvidos relacionados a resistência adquirida
751 devem que ser levados em consideração (Saha; Sarkar, 2021).

752 Os mecanismos onipresentes de troca de DNA e alta taxa de mutação
753 espontânea em bactérias são os principais impulsionadores das bactérias super-
754 resistentes (Nikaido, 2009). O gene ou os elementos genéticos responsáveis pela
755 resistência adquirida podem ser cromossômicos ou extracromossômicos (Das et al.,
756 2020), sendo os extracromossômicos, plasmidiais, de maior importância para a
757 problemática da resistência bacteriana a antibacterianos.

758 2.6.5 Mutações

759 As bactérias têm uma taxa média de uma mutação para cada 10^6 a
760 10^9 nas divisões celulares (Reygaert, 2018). Essas alterações genéticas abrangem
761 mudanças em pontos chaves para o desenvolvimento de resistência a antibacterianos
762 como mutações em proteínas bacterianas ou nos elementos reguladores (Woodford;
763 Ellington, 2006). Entretanto, embora confirmam caráter de resistência, o fazem com
764 custo para o organismo, sendo a maioria dessas mutações é prejudicial para a própria
765 célula (Coculescu, 2009; Davies; Davies, 2010; Reygaert, 2018). Exemplo é a
766 aquisição de resistência à metilina em *Staphylococcus aureus*, que, por exemplo,
767 resultou na redução da taxa de crescimento da bactéria (Reygaert, 2018).

768 Os principais focos de mutação que podem acarretar resistência as
769 moléculas terapêuticas são em alvos da molécula do antibacteriano (Kapoor; Saigal;
770 Elongavan, 2017), em genes envolvidos na regulação ou composição da membrana
771 celular, alterando permeabilidade (Delcour, 2009), em genes que codificam enzimas
772 inativadoras de antibacterianos (Munita; Arias, 2016; Egorov et al., 2018) e em
773 elementos regulatórios, como regiões promotoras ou fatores de transcrição, que levam

774 ao aumento ou diminuição da produção de proteínas específicas envolvidas na
775 suscetibilidade aos antibacterianos (Depardieu et al., 2007).

776 É importante observar que as mutações ocorrem aleatoriamente e
777 podem surgir em populações bacterianas mesmo na ausência de exposição a
778 antibacterianos (Nacional Research Council, 1980). No entanto, a presença dessas
779 moléculas fornece pressão seletiva que favorece a sobrevivência e propagação de
780 bactérias com mutações vantajosas (Santos-Lopez et al., 2021).

781 Fenótipos de resistência podem ser alterados por mutações, uma vez
782 que podem afetar como essas resistências são expressas (Poole, 2001). Por exemplo,
783 as enzimas AmpC, apresentam normalmente pouca atividade contra as
784 cefalosporinas de quarta geração. Entretanto, a mutante AmpC apresenta espectros
785 de atividade expandidos para incluir cefepima e ceftiproma no seu espectro de
786 resistência (Wachino et al., 2006; Mammeri et al., 2004) assim como variantes
787 mutantes de TEM e SHV (beta-lactamases de espectro estendido) conferem
788 resistência aos inibidores de beta-lactamases (Woodford; Ellington, 2006),
789 diferentemente das cepas mãe.

790 Mutações que conferem resistência a antibacterianos podem ser
791 transferidas entre diferentes espécies ou cepas de bactérias por meio de processos
792 como conjugação, transformação e transdução (Wintersdorff et al., 2016) (tópico
793 2.6.7), e por isso, são importantes entre linhagens dos mesmos gêneros de
794 microrganismos ou de gêneros diferentes (Horton; Taylor, 2023).

795 2.6.6 Proteção, Alteração e Desvio de Sítios Alvo

796 A proteção do sítio alvo, que impede que o antibacteriano atinja seu
797 local de ligação, a modificação no sítio alvo, que resulta em afinidade reduzida entre
798 o alvo e o antibacteriano, a alteração enzimática no sítio de ligação da molécula
799 antibacteriana no microrganismo e substituição ou desvio do alvo original (Munita;
800 Arias, 2016) torna bactérias menos suscetíveis aos efeitos da terapia antibiótica
801 (Reygaert, 2018).

802 Diferentemente da alteração do sítio alvo, a proteção não envolve
803 uma mudança permanente na natureza do alvo (Wilson et al., 2020), sendo os três
804 tipos de proteção ao alvo descritos. O tipo I, que é deslocamento direto do antibiótico,
805 pode mediar a resistência a antibacterianos pela remoção da droga do alvo por

806 deslocamento físico, além de competir com o alvo da droga. O tipo II é referente a
807 remoção alostérica do antibiótico, que induz mudanças conformacionais dentro do
808 alvo, dissociando o antibacteriano do alvo. O tipo III é relacionado a restauração da
809 função alvo, apesar da presença de ligação antibiótico, induzindo a mudanças
810 conformacionais dentro do alvo e restaurando a sua funcionalidade apesar da
811 presença do antibacteriano ligado (Wilson et al., 2020).

812 Os mecanismos associados a resistência à tetraciclina Tet(M) e
813 Tet(O) são exemplos clássicos de proteção ao alvo (Wilson et al., 2020). Essas
814 proteínas competem com a tetraciclina pelo mesmo espaço ribossômico e alteram a
815 geometria do local de ligação do antibacteriano, desalojando a tetraciclina de seu sítio
816 de ligação, deslocando a molécula do ribossomo e permitindo a retomada da síntese
817 de proteínas (Dönhöfer et al., 2012; Li et al., 2013).

818 Na modificação dos sítios alvo, a interação da proteína de resistência
819 e o alvo do antibacteriano ocorrem apenas uma vez e resulta na alteração química
820 (Wilson et al., 2020), sendo um dos mecanismos mais comuns de resistência a
821 antibióticos em patógenos bacterianos (Lambert, 2005). Essas alterações de alvo
822 podem consistir em mutações pontuais nos genes que codificam ou promotoras do
823 sítio alvo, alterações enzimáticas do sítio de ligação, como por exemplo, adição de
824 grupos metil e/ou substituição ou desvio do alvo original, afetando todas as classes
825 de antibacterianos (Rossini; Dias, 2023; Munita; Arias, 2016).

826 Um dos exemplos é o desenvolvimento de resistência à rifampicina,
827 que ocorre por mutações que resultam em substituições de aminoácidos no gene
828 conservado de RNA polimerase (Munita; Arias, 2016). A resistência à fluoroquinolonas
829 também pode ser resultante da mutação no sítio alvo, que tem potencial para
830 mutações a nível cromossômico na DNA girase e enzimas alvo da topoisomerase IV
831 (Lambert, 2005).

832 Além da mutação genômica, há a alteração enzimática no sítio alvo
833 como fator de resistência. Macrolídeos, lincosamidas e eritromicinas são grupos de
834 antibacterianos que bloqueiam a síntese de proteínas em bactérias por ligação à
835 subunidade ribossômica 50S (Peterson; Kaur, 2018). A resistência a essas moléculas
836 antibacterianas que ocorre em Gram-negativas (Weisblum, 1995) comumente envolve
837 a metilação por rRNA metiltransferases (Douthwaite et al., 2004).

838 Há, ainda, a substituição completa do alvo ou desvio do alvo. Usando
839 esta estratégia, as bactérias são capazes de desenvolver novos locais moleculares

840 semelhantes ao alvo, que realizam funções bioquímicas como do alvo original, mas
841 que não são inibidas pela molécula antimicrobiana. Os exemplos clínicos mais
842 relevantes incluem resistência à metilcolina em *Staphylococcus aureus* (MRSA) devido
843 à aquisição de uma proteína de ligação à penicilina (PBP) exógena, PBP2a. PBP2a,
844 produto da aquisição e expressão do gene *mecA* (Enright et al., 2002), gene originário
845 de cromossômico estafilocócico, por exemplo, é um PBP que apresenta baixa
846 afinidade por todos os beta-lactâmicos, com exceção de cefalosporinas de última
847 geração (Leski; Tomasz, 2005).

848 Por fim, aumentar a produção do alvo do antibacteriano para
849 sobrecarregá-lo também é uma forma de resistência, descrita principalmente na
850 resistência a sulfametoxazol + trimetoprima (Eliopoulos; Houvinen, 2001). A
851 superprodução de di-hidrofolato redutase (DHFR) ou di-hidropteróico sintase (DHPS),
852 inibidos por trimetoprima e sulfametoxazol, respectivamente, por meio de mutações
853 na região promotora do DNA que codifica essas enzimas, resultam na produção de
854 quantidades que superam a capacidade do antibacteriano inibir a produção de folato
855 e permitindo a sobrevivência da bactéria (Flensburg; Skold, 1987).

856 2.6.7 Transferência Horizontal de Genes

857 A aquisição de DNA exógeno através da transferência horizontal de
858 genes é frequentemente associada a problemática associada da difusão de genes de
859 resistência sob a pressão seletiva do uso de agentes antibacterianos (Bobate et al.,
860 2023; Lerminiaux; Cameron, 2019; Prestinaci; Pezzotti; Pantosti, 2015). A troca
861 genética, proporcionada por esse mecanismo de evolução bacteriano tem sido ponto
862 chave na disseminação da resistência a moléculas antibacterianas usadas na
863 medicina humana e veterinária (Munita; Arias, 2016). Essa integração do DNA
864 exógeno pode resultar na aquisição de novos traços genéticos pela bactéria receptora
865 (Borodovich et al., 2022; Torres-Barceló, 2018).

866 Por meio da transferência horizontal, existe a possibilidade de
867 recepção de genes para uma via metabólica nova, que alteram do sistema chave-
868 fechadura por alteração da parede bacteriana, que ocasionam mutações que limitam
869 o acesso de intracelular, que regulam a expressão da porina e de bombas de efluxo,
870 além das enzimas de degradação de antibacterianos, como beta-lactamases
871 (Tenover, 2006; Lerminiaux; Cameron, 2019; Moore-Machacek et al., 2023).

872 A transformação é um processo gênico natural que ocorre em
873 bactérias que absorvem e incorporam material genético estranho em seu próprio
874 genoma. Esse processo é continuamente custoso a bactéria e nem sempre é bem-
875 sucedido (Van Dijk et al., 2020). Algumas bactérias possuem mecanismos específicos
876 que induzem competência para recepção do DNA exógeno, que podem ser
877 desencadeados por fatores como limitação de nutrientes, densidade celular ou
878 exposição a agentes que danificam DNA (Mell; Redfield, 2014).

879 As proteínas necessárias para ligação, processamento e
880 internalização na maioria de bactérias Gram-positivas e negativas são proteínas
881 homólogas do tipo II sistemas de secreção (T2S) e pili tipo IV (T4P). Quando a
882 captação de DNA é mediada por T4P, filamentos longos emanam da superfície dessas
883 bactérias. O T4P se liga ao DNA extracelular e, pela ação de uma ATPase de retração,
884 puxa o DNA para o espaço periplasmático, passando pela membrana externa, a
885 parede celular de peptidoglicano em Gram-negativas. Após, o DNA se transloca para
886 o citosol, onde pode ocorrer recombinação homóloga (Muschiol et al., 2015).

887 A recombinação, mecanismo comum de integração, é um processo
888 em que segmentos de DNA são trocados. Nas bactérias ocorre quando o material
889 genético exógeno se alinha com uma região semelhante no cromossomo bacteriano
890 e substitui o segmento correspondente (Mell; Redfield, 2014). Após a integração, os
891 genes estranhos tornam-se parte do genoma bacteriano e podem ser expressos
892 produzindo as proteínas. A proteína RecA é uma proteína chave envolvida na
893 recombinação homóloga em várias bactérias (Vries; Wackernagel, 2004).

894 A transdução se refere ao processo pelo qual o material genético
895 bacteriano é transferido de uma bactéria para outra por meio de um bacteriófago, que
896 têm uma gama específica de hospedeiros (Kasman; Porter 2022). Partículas que
897 realizam a transdução, os fagos, sequestram a maquinaria celular para replicar seu
898 próprio material genético e produzir novas partículas e que ejetam DNA bacteriano
899 quando infectam outras células. O DNA pode se recombinar no cromossomo ou
900 replicar como um plasmídeo na nova célula hospedeira (Chiang; Penades; Chen,
901 2019). Este processo geralmente envolve a degradação do genoma bacteriano
902 seguida pela síntese de componentes do bacteriófago (Gummalla et al., 2023).

903 A transdução pode acontecer de duas formas: a generalizada e a
904 especializada. Na transdução generalizada, durante a montagem de novas partículas
905 de fago, ocasionalmente qualquer parte do DNA bacteriano pode ser empacotado

906 dentro do capsídeo do fago junto com seu genoma (Casjens; Weigele, 2013;
907 Gummalla et al., 2023). Após as novas partículas de fago montadas e maduras, no
908 ciclo lítico, a lise da célula bacteriana hospedeira é desencadeada, as partículas de
909 fago produzidas carregam o DNA bacteriano específico e o transferem para uma nova
910 bactéria hospedeira e conforme a célula hospedeira desintegra, o cromossomo
911 bacteriano é fragmentado, liberando as partículas de fago no ambiente (Gummala et
912 al., 2023; Kasman; Porter, 2022).

913 Na transdução especializada, regiões específicas do genoma
914 bacteriano são transferidas (Chiang; Penadés; Chen, 2019). No ciclo lisogênico o fago
915 insere seu DNA na célula hospedeira, se integrando ao DNA bacteriano, que passa a
916 se chamar “prófago” (Kasman; Porter, 2022). Os fagos com capacidade de passar por
917 esse ciclo lisogênico codificam enzimas específicas, como um gene repressor
918 transcricional e integrases (Torres-Barceló, 2018). A propagação passiva de prófagos
919 pode evoluir para ciclo lítico sob condições ambientais negativas e como resultado, o
920 genoma do fago é liberado do cromossomo hospedeiro no ambiente (Torres-Barceló,
921 2018). Os fragmentos de DNA do bacteriófago podem ser introduzidos no genoma do
922 novo hospedeiro por meio de recombinação.

923 Além desses mecanismos, o fenômeno da conjugação em bactérias
924 desempenha o papel principal no desenvolvimento e disseminação da resistência a
925 antibacterianos (Virolle et al., 2020). Esse é um mecanismo que permite a troca de
926 genes entre o mesmo gênero ou espécies diferentes e envolve a transferência de
927 material genético através do contato físico direto entre duas células bacterianas (Tao
928 et al., 2022; Forsberg et al., 2012). Elementos conjugativos, incluindo plasmídeos,
929 transposons conjugativos e integrons, são um mecanismo de transferência de DNA
930 universalmente conservado entre bactérias Gram-negativas sendo comuns em
931 comunidades bacterianas de solo, na superfície das plantas, e em água e esgoto, bem
932 como em biofilmes e hospedeiros animais (Virolle et al., 2020).

933 Os plasmídeos conjugativos são responsáveis pela transferência
934 unidirecional de DNA por meio de uma estrutura chamada *pilus*, que forma uma ponte
935 entre as células doadoras e receptoras (Virolle et al., 2020), agindo essencialmente
936 como um gancho que é retraído ao doador para efetuar o contato entre bactérias
937 quando um poro de transferência de DNA se forma para ligar os compartimentos
938 citoplasmáticos das células unidas, ou como canal para o DNA durante a transferência
939 entre células fisicamente distantes (Goldlust et al., 2023). Conjugação é um processo

940 replicativo que deixa tanto o doador quanto o receptor com uma cópia do plasmídeo
941 (Virolle et al., 2020).

942 A conjugação facilita a adaptação de cepas bacterianas pela
943 propagação por meio desse mecanismo propriedades metabólicas vantajosas, como
944 estilo de vida simbiótico, fatores de virulência, resistência a metais pesado, á
945 antibacterianos e substâncias tóxicas ou ainda fornecem enzimas que expandem a
946 capacidade nutricional da célula (Virolle et al., 2020). O transporte de um tipo de gene
947 não impede o transporte de outros (Shintani; Sanchez; Kimbara, 2015).

948 Os transposons são sistemas de genes saltadores que têm a
949 capacidade de se mover intra e inter moléculas, ou seja, por exemplo, pular de um
950 plasmídeo para outro, ou de um plasmídeo para um cromossomo bacteriano
951 (Lerminiaux; Cameron, 2019). Um transposon difere de um elemento de sequência de
952 inserção, como os bacteriófagos, por codificar pelo menos uma função que altera o
953 fenótipo da célula de forma previsível, e são capazes de se mover de forma aleatória
954 na mesma molécula ou em células diferentes, não requerendo necessariamente
955 identidade de DNA entre o elemento e os locais de inserção (Partridge et al., 2018).

956 Ainda são descritos outros mecanismos de transferência horizontal de
957 genes, como a conversão lisogênica, a transposição, a fusão de protoplastos e as
958 vesículas de membrana em bactérias da família *Enterobacteriaceae* e bactérias não
959 fermentadoras (Chatterjee et al., 2017; Caruana; Walper, 2020; Arnold et al., 2021)
960 capazes de transferir, inclusive, beta-lactamases (Tao et al., 2022).

961 2.6.8 Modificação e Inativação das Moléculas Antimicrobianas por Enzimas

962 A inativação de drogas terapêuticas por enzimas produzidas por
963 bactérias ocorre pela quebra ou modificação a estrutura da molécula, tornando-a
964 menos eficaz ou inativa por vias metabólicas, como acetilação, fosforilação ou
965 adenilação, que modificam grupos funcionais na molécula (Egorov et al., 2018).

966 As acetiltransferases são as enzimas responsáveis por catalisar a
967 acetilação. Essas enzimas transferem um grupo acetil de uma molécula doadora -
968 normalmente acetil coenzima A (acetil-CoA) - para o substrato do antibacteriano, o
969 que pode ocorrer em diferentes grupos funcionais da molécula, como grupos amino
970 ou hidroxila, dependendo da molécula antibacteriana específica e da acetiltransferase
971 envolvida (Favrot; Blanchard; Vergnolle, 2016). A adição de um grupo acetil à

972 molécula antibacteriana pode alterar sua estrutura e propriedades, afetando sua
973 capacidade de interagir com alvos bacterianos ou interrompendo seu modo de ação.
974 Essa modificação comumente reduz a afinidade de ligação do antibacteriano ao seu
975 local-alvo, impede sua penetração na bactéria ou interfere em sua capacidade de inibir
976 processos bacterianos essenciais (Kapoor; Saigal; Elongavan, 2017). A resistência a
977 antibióticos mediada pela acetilação foi observada com várias classes de antibióticos,
978 incluindo aminoglicosídeos, cloranfenicol e sulfonamidas. Por exemplo, as
979 acetiltransferases podem acetilar grupos amino específicos em antibióticos
980 aminoglicosídeos, levando à redução da ligação aos ribossomos bacterianos e
981 diminuição da inibição da síntese proteica (Ergorov et al., 2018).

982 A fosforilação, por sua vez, é um processo biológico em que um grupo
983 fosfato é adicionado a fim de provocar mudanças no alvo do antibacteriano ou
984 alterações em vias metabólicas bacterianas (Peterson; Kaur, 2018; Casey; Orth,
985 2018). Por meio desse mecanismo há modificação em suas próprias proteínas
986 ribossômicas, tornando o antibacteriano ineficaz na ligação aos ribossomos (Sun et
987 al., 2012).

988 A resistência contra antibacterianos por adenilação é um mecanismo
989 menos comum, onde ocorre a adição de um grupo adenosina monofosfato a grupos
990 funcionais específicos na molécula do antibacteriano, facilitado por enzimas
991 conhecidas como adenililtransferases, que alteram a sua estrutura reduzindo sua
992 capacidade de interagir com seu alvo (Clark; Pazdernik; McGehee, 2019). A
993 resistência a antibióticos mediada por adenilação foi observada em algumas classes,
994 como aminoglicosídeos e cloranfenicol. Por exemplo, adenililtransferases podem
995 adicionar adenila a aminoglicosídeos impedindo que se ligue aos ribossomos
996 bacterianos e iniba a síntese de proteínas (Clark; Pazdernik; McGehee, 2019).

997 Entretanto, um dos principais mecanismos enzimáticos de inativação
998 de moléculas antibióticas é a hidrólise, que se consiste em uma reação química que
999 quebra de ligação intramolecular pela adição de uma molécula de água por acilação
1000 (He et al., 2021). As macrolídeos esterases catalisam a hidrólise das ligações éster
1001 em macrolídeos, como a eritromicina e a claritromicina, interrompendo a estrutura e
1002 reduzindo sua atividade contra as bactérias (Dinos, 2017). Da mesma forma, no caso
1003 das beta-lactamases, a reação de hidrólise envolve a adição de uma molécula de água
1004 ao anel beta-lactâmico, resultando em sua clivagem e inativação dos antibióticos
1005 dessa classe (Munita; Arias, 2016; Bonomo, 2017; Dinos, 2017).

1006 2.6.8.1 Beta-lactamases

1007 Beta-lactamases são os mecanismos de resistência predominantes
1008 contra os beta-lactâmicos em bactérias Gram-negativas (Munita; Arias, 2016), está
1009 associado aos fenótipos multirresistentes observados em isolados clínicos (De Angelis
1010 et al., 2020) e incluem mais de 2000 sequências de aminoácidos únicas e naturais
1011 (Bonomo, 2017). Sua ação se dá pela clivagem da ligação amida do anel beta-
1012 lactâmico, o componente central dos antibióticos beta-lactâmicos, tornando os
1013 antibióticos inativos. Essas enzimas atuam principalmente como catalisadoras,
1014 facilitando a reação de hidrólise ao fornecer um sítio ativo onde ocorre a reação
1015 (Bonomo, 2017; Tooke et al., 2019).

1016 De forma geral, a reação de hidrólise prossegue por meio de duas
1017 etapas. Na primeira, uma enzima beta-lactamase transfere de um próton para a
1018 molécula de água, tornando-a nucleofílica. Essa molécula de água ativa ataca o anel
1019 beta-lactâmico, quebrando e formando um intermediário acil-enzima. Na segunda
1020 etapa, outra molécula de água envolvida atua como nucleófilo para hidrolisar ainda
1021 mais o intermediário acil-enzima, resultando na clivagem completa do anel beta-
1022 lactâmico e inativação completa do antibacteriano (He et al., 2020; Bonomo, 2017).

1023 Beta-lactamases (classe A) inativam beta-lactâmicos em várias
1024 etapas de inserção e retirada de uma acila (acilação e desacilação). Primeiro, após
1025 ligação do beta-lactâmico, o ataque nucleofílico pela serina no grupo carbonila do
1026 antibiótico resulta em um intermediário de acilação de alta energia. Em seguida, esse
1027 intermediário “transiciona” para uma enzima acil covalente de energia mais baixa.
1028 Uma molécula de água catalítica ataca o complexo covalente e leva a um intermediário
1029 de desacilação de alta energia, com subsequente hidrólise da ligação entre o beta-
1030 lactâmico carbonilado e o oxigênio da serina. Por último, a desacilação regenera a
1031 enzima ativa e torna o beta-lactâmico inativo (Bonomo, 2017).

1032 A reação de hidrólise catalisada por beta-lactamases da classe C é
1033 parecida com as da classe A pois também depende da acilação e desacilação, porém
1034 com as fases em estado de transição tetraédrico de alta energia. Na metade da reação
1035 de acilação, o carbono do anel beta-lactâmico é atacado, sendo formado um complexo
1036 covalente acil-enzima. Na desacilação, uma base geral ativa a água desacilante
1037 estruturalmente conservada. Na etapa de desacilação, a água catalítica reage com a
1038 ligação covalente entre a enzima e o substrato, levando à liberação do produto

1039 hidrolisado (Bonomo, 2017).

1040 As beta-lactamases podem ser classificadas de acordo com o sistema
1041 Bush-Jacoby, baseado em perfis de hidrólise de substrato (penicilina, cefalosporina,
1042 cefalosporina de espectro estendido, carbapenêmicos) e perfil de inibição (inibidores
1043 de beta-lactamase, ácido clavulânico e tazobactam) ou pela classificação de Ambler
1044 (Ambler, 1991), que classifica as enzimas com base no tamanho molecular e na
1045 homologia da sequência de aminoácidos do sítio ativo (Bonomo, 2017; Kapoor; Saigal;
1046 Elongavan, 2017; Bush, 2018).

1047 De acordo com Amber, as beta-lactamases são divididas em quatro
1048 classes: as serina-beta-lactamases (SBLs) de sítio ativo (classes A, C e D), que
1049 possuem similaridade estrutural e as dependentes de zinco ou metalo-beta-
1050 lactamases (MBLs; classe B) (De Angelis et al., 2020; Bonomo, 2017).

1051 Cada classe de beta-lactamases tem um mecanismo de ação distinto
1052 e especificidade de substrato, sendo que algumas têm a especificidade de substrato
1053 mais ampla inativando vários beta-lactâmicos. Serina-beta-lactamases são
1054 distantemente relacionadas a PBPs, com os quais compartilham a sequência de
1055 aminoácidos conservada Ser-Xaa-Xaa-Lys, que empregam serinas como o
1056 nucleófilo da reação e hidrolisam beta-lactâmicos através de um intermediário
1057 acilenzima covalente. Por sua vez, as metalo-beta-lactamases utilizam um nucleófilo
1058 de água ativado por metal para conduzir a reação hidrolítica (Tooke et al., 2019).

1059 A classe A das beta-lactamases, também chamada de penicilinasas,
1060 usam um resíduo de serina em seu sítio ativo para hidrolisar o anel beta-lactâmico.
1061 Pertencem a essa classe beta-lactamases tipo TEM, ativa contra aminopenicilinas e
1062 cefalosporinas, tipo Sulfidril Variável (SHV), que é originada do gene cromossomal
1063 de *K. pneumoniae*, tipo cefotaximase (CTX), enzima intrinsecamente ativa contra a
1064 oximiinocefalosporina cefotaxima e tipo *K. pneumoniae* carbapenemases (KPC)
1065 (Palzkill, 2018; Tooke et al., 2019).

1066 As beta-lactamases TEM, SHV e CTX-M são encontradas
1067 principalmente em *Enterobacteriaceae* (Bonomo, 2017) e são amplamente
1068 disseminadas via elementos genéticos móveis e têm a capacidade de aumentar seu
1069 espectro de atividade à medida que novos substratos são contactados. Normalmente
1070 TEM e SHV são penicilinasas com pouca ou nenhuma atividade contra as
1071 cefalosporinas (Kapoor; Saigal; Elongavan, 2017). Quando essas beta-lactamases
1072 passaram a conferir resistência às cefalosporinas de última geração, elas foram

1073 designadas como ESBLs, e passaram a incluir membros das famílias de enzimas
1074 CTX-M e OXA (classe D) (Reygard et al., 2018).

1075 As MBLs de classe B, que são frequentemente identificadas em
1076 *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos (*Carbapenem Resistant*
1077 *Enterobacterales* - CRE) é um grupo dos quais pertencem enzimas como *New Delli*
1078 *metalo-beta-lactamase* (NDM-1), *Imipenemase* (IMP), *German imipenemase* (GIM),
1079 São Paulo *metalo-beta-lactamase* (SPM), *Seoul imipenemase* (SIM) e *Verona*
1080 *Integron-encoded* *metalo-beta-lactamase* (VIM) (Queenan; Bush, 2007; Lee et al.,
1081 2016).

1082 Essas enzimas são membros de uma grande, antiga e amplamente
1083 distribuída superfamília de metalo-hidrolases e são dependentes mais comumente de
1084 zinco (Zn^{2+}) ou outros metais pesados para catálise e sua atividade é inibida por
1085 agentes quelantes (Kapoor; Saiga; Elongavan, 2017). Enzimas dependentes de Zn^{2+}
1086 seguem um mecanismo hidrolítico, o qual usam o grupo hidroxila (OH) de uma
1087 molécula de água, que é coordenada por Zn^{2+} , para hidrolisar a ligação amida cindível
1088 de um beta-lactâmico na presença de intermediário aniônico de alta energia (Bonomo,
1089 2017).

1090 MBL agem sobre uma variedade de substratos que se estendem de
1091 várias moléculas pequenas (tiolésteres, fosfonatos) até ácidos nucleicos (Baier;
1092 Tokuriki, 2014; Bebrone, 2007). Essas classes de enzimas são resistentes à
1093 inativação por ácido clavulânico, sulbactam, aztreonam e carbapenêmicos e podem
1094 hidrolisar todos os antibióticos beta-lactâmicos clinicamente disponíveis, incluindo
1095 alguns carbapenêmicos, que geralmente são substratos fracos para beta-lactamases
1096 baseadas em serina das classes A, C e D (He et al., 2020).

1097 As beta-lactamases da classe C, genes denotados normalmente
1098 como AmpC e chamadas de cefalosporinases, estão amplamente distribuídas nos
1099 cromossomos espécies Gram-negativas e em condições normais não são expressas.
1100 No entanto, a não repressão desses genes, seja como resultado de mutação ou por
1101 indução por beta-lactâmicos específicos, pode levar a expressão de alto nível com
1102 consequente elevação da concentração inibitória mínima (MIC) para beta-lactâmicos
1103 suscetíveis (Juan et al., 2017).

1104 A relevância clínica das enzimas de classe C é ainda reforçada pela
1105 disseminação de certos membros da família, como as enzimas CMY, FOX e DHA, em
1106 elementos genéticos móveis em *Enterobacterales* (Tooke et al., 2019). Classe C

1107 hidrolisa cefalosporinas, incluindo cefalosporinas de espectro estendido e é resistente
1108 a todos os beta-lactâmicos, exceto aos carbapenêmicos, não sendo inibidos por ácido
1109 clavulânico (Kapoor; Saigal; Elongavan, 2017).

1110 Enzimas da classe D são todas denominadas oxacilinase (OXA) e têm
1111 determinante da sua atividade a carboxilação da lisina conservada do sítio ativo
1112 surgido da reação reversível com o dióxido de carbono atmosférico (Tooke et al.,
1113 2019). Existe uma preocupação particular envolvendo os grupos OXA-23, 24, 40 e 48,
1114 responsáveis pela resistência a carbapenêmicos em *Enterobacteriales* (Palzkill,
1115 2018). As beta-lactamases OXA utilizam essa lisina carbamilada para ativar a serina
1116 nucleofílica usada para a hidrólise de beta-lactâmicos, uma vez que a molécula de
1117 água desacilante se aproxima da espécie acil-enzimática ancorada na serina
1118 nucleofílica, usando a lisina carbamilada como âncora química (Verma et al., 2011).

1119 É comumente assumido que os PBPs foram os precursores das beta-
1120 lactamases, sendo considerado até que alguns PBPs podem ter evoluído para
1121 funcionar como beta-lactamases fracas com mudança lenta do substrato beta-
1122 lactâmico, uma vez que apresentam similaridades estruturais, assim como mecanismo
1123 de desacilação com tempos diferentes (Bush, 2018). Um exemplo dessa teoria de
1124 origem são as taxas de desacilação da cefotaxima, cerca de 70 a 80 vezes maiores
1125 para variantes de PBP2x do que para a enzima de tipo selvagem em *S. pneumoniae*
1126 (Lu et al., 2001).

1127 Os inibidores de beta-lactamases são alternativas para combate a
1128 essas enzimas em cepas CRE (Everett et al., 2018; Brennan-Krohn et al., 2020). São
1129 estruturalmente semelhantes a beta-lactamases e isoladamente possuem fraca
1130 capacidade antimicrobiana, mas funcionam sinergicamente em combinação com um
1131 beta-lactâmico (Toussaint; Gallagher, 2015). Os pares inibidores de beta-lactamases
1132 / medicamentos comumente usados incluem amoxicilina / ácido clavulânico,
1133 ampicilina / sulbactam e piperacilina / tazobactam (Reygart et al., 2018).

1134 2.6.8.1.1 *Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)*

1135 As ESBLs representam um dos tipos mais comuns de enzimas que
1136 degradam antibióticos. Ao contrário de outras beta-lactamases, têm uma
1137 especificidade de substrato mais ampla, devido à substituição de aminoácidos (Shaikh
1138 et al., 2015), permitindo a hidrólise de diferentes beta-lactâmicos (Rawat; Nair, 2010;

1139 Peirano; Pitout, 2019). A aquisição de mutações pontuais que permitem a TEM e SHV,
1140 por exemplo, hidrolisar oximiinocefalosporinas como cefotaxima e ceftazidima, gerou
1141 o chamado fenótipo de “espectro estendido” (Tooke et al., 2019).

1142 ESBLs incluem as famílias de TEM, SHV, cefalosporinases com perfis
1143 de hidrólise de substrato expandidos, CTX-M e enzimas OXA hidrolisadoras de
1144 cefalosporinas de espectro estendido (Ghafourian et al., 2015). São resistentes a
1145 penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração (como cefotaxima,
1146 ceftriaxona, ceftazidima, cefepima, cefamandol, cefoperazona) e monobactâmicos
1147 (aztreonam), mas são sensíveis a metoxicefalosporinas (por exemplo, cefamicinas e
1148 carbapenêmicos), além de serem inibidas por inibidores de beta-lactamases, por
1149 exemplo, ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam (Kapoor; Saigal; Elongavan,
1150 2017).

1151 O progenitor da classe de enzimas SHV, SHV-1, é encontrado
1152 universalmente em *K. pneumoniae* e por isso sugere-se que a família SHV de beta-
1153 lactamases é descendente de *Klebsiella* spp. SHV-1, localizado em um gene
1154 cromossômico, foi posteriormente incorporado a um plasmídeo que se espalhou para
1155 outras espécies de enterobactérias (Shaikh et al., 2015). A maior parte de SHV já
1156 detectada foi descrita em *K. pneumoniae* ou *E. coli* (Liakopoulos; Mevius; Ceccarelli,
1157 2016). SHV-1 confere resistência à cefalosporinas de terceira geração e
1158 monobactâmicos (Liakopoulos; Mevius; Ceccarelli, 2016; Poirel et al., 2003) e é
1159 responsável pela resistência à ampicilina em espécies de *K. pneumoniae*
1160 (Tzouveleki, 1999; Tzouveleki; Bonomo, 1999).

1161 As ESBLs do tipo TEM foram as primeiras beta-lactamases
1162 transmitidas por plasmídeo identificadas em bactérias Gram-negativas (Palzkill, 2018;
1163 Tooke et al., 2019) e derivam de TEM-1 e TEM-2 (Paterson; Bonomo, 2005). TEM-1
1164 foi relatada pela primeira vez em 1960 de uma *E. coli*, em uma paciente grega
1165 chamada de Temoniera (Rawat; Nair, 2010) (por isso TEM), e tem substrato e perfis
1166 de inibição semelhantes ao SHV-1 sendo capaz de hidrolisar penicilinas e
1167 cefalosporinas de primeira geração, mas incapaz de atacar o oximino-cefalosporina
1168 de espectro estendido, além de ser inibido pelo ácido clavulânico (Paterson; Bonomo,
1169 2005). TEM-2 foi o primeiro derivado de TEM-1, e teve uma única substituição de
1170 aminoácido da beta-lactamase original. O TEM-13 também possui um perfil hidrolítico
1171 semelhante ao TEM-1 e TEM-2. Entretanto, TEM-1, TEM-2 e TEM-13 são
1172 consideradas beta-lactamases, mas não de espectro estendido, devido à capacidade

1173 de ação limitado contra beta-lactâmicos (Shaikh et al., 2015; Paterson; Bonomo,
1174 2005).

1175 A primeira variante TEM com maior atividade contra cefalosporinas de
1176 espectro estendido foi TEM-3, que foi a primeira beta-lactamase do tipo TEM que
1177 apresentou o fenótipo ESBL. Ela difere da TEM-2 por duas substituições de
1178 aminoácidos (Paterson; Bonomo, 2005).

1179 TEM-1, SHV-1 e *bla*1 (beta-lactamase tipo 1) são beta-lactamases
1180 que compartilham pelo menos 30% de identidade, e as mutações das enzimas
1181 mencionadas são responsáveis pelos fenótipos ESBL (Eiamphungporn et al., 2018).
1182 TEM-1, TEM-2 e SHV-1 diferem de seus progenitores por apenas um aminoácido,
1183 mudança que resultou no aumento do sítio ativo da enzima, permitindo que se desvie
1184 dos substitutos oximino, que normalmente protegem o anel beta-lactâmico. Isso
1185 ocorreu alguns anos após a introdução de novos beta-lactâmicos na prática clínica
1186 substituídos por uma cadeia lateral oximino (por exemplo, aztreonam e as
1187 cefalosporinas de terceira geração ou espectro expandido) (De Angelis et al., 2020).

1188 Assim, mutantes descendentes são capazes de hidrolisar antibióticos,
1189 como as cefalosporinas de terceira geração ou aztreonam, o que não é possível para
1190 as bactérias parentais (Rawat; Nair, 2010). Os maiores grupos mutantes de TEM e
1191 SHV beta-lactamases, cerca de 240, são codificados principalmente por plasmídeos
1192 e tem alta capacidade de serem compartilhadas entre populações bacterianas (De
1193 Angelis et al., 2020).

1194 CTX-M representam o segundo maior grupo de ESBLs beta-
1195 lactamases e incluem mais de 220 diferentes enzimas agrupadas em cinco
1196 subfamílias baseadas em suas sequências de aminoácidos: CTX-M-1 e subfamílias
1197 CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (Peirano; Pitout, 2019). As enzimas do tipo
1198 CTX-M são as ESBLs mais prevalentes em *Enterobacteriaceae* em todo o mundo (De
1199 Angelis et al., 2020).

1200 O nome CTX reflete a potente atividade hidrolítica dessas beta-
1201 lactamases contra a cefotaxima (Paterson; Bonomo, 2005). As enzimas CTX-M são
1202 mais ativas contra cefotaxima e ceftriaxona do que contra ceftazidima, mas mutações
1203 ao redor do sítio ativo aumentaram significativamente sua capacidade de hidrolisar
1204 essa molécula antibacteriana (Peirano; Pitout, 2019).

1205 Enquanto SHV e TEM foram gerados por substituições aminoácidos
1206 de suas enzimas parentais, CTX-M foi adquirido pela via de transferência horizontal

1207 de outras bactérias por transposon ou conjugação via plasmídeo de genes
1208 cromossomais de *Kluyvera* spp. uma vez que o gene de sequências adjacentes aos
1209 genes CTX-M de *Enterobacteriaceae* também são semelhantes à aqueles que cercam
1210 os genes das beta-lactamases nos cromossomos dessa espécie (Bush; Jacoby, 2010;
1211 Rawat; Nair, 2010; Shaikh et al., 2015; De Angelis et al., 2020).

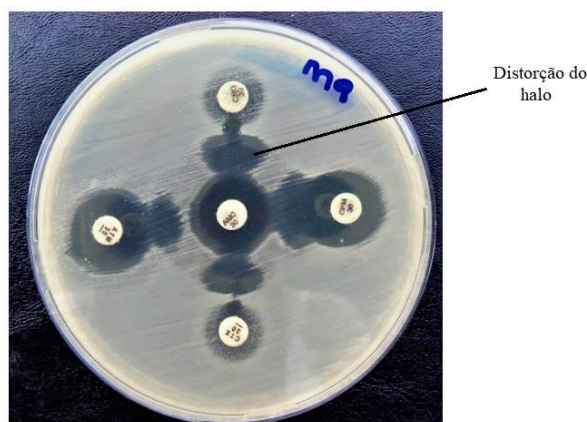
1212 As beta-lactamases do tipo OXA são assim denominadas devido à
1213 capacidade de hidrolisar a oxacilina e cloxaciclina (Evans; Amyes, 2014). A OXA mais
1214 comum, OXA-1 é frequentemente encontrada em *E. coli* (Livermore, 1995). Nem todas
1215 as beta-lactamases do tipo OXA hidrolisam as cefalosporinas de amplo espectro em
1216 grau significativo e não são consideradas ESBL. No entanto, algumas conferem
1217 resistência à cefotaxima, e às vezes ceftazidima e aztreonam (Paterson; Bonomo,
1218 2005), devido a mutações pontuais que aumentaram a capacidade de realizar esse
1219 tipo de hidrólise (Paterson; Bonomo, 2005; Cantón; González-Alba; Galán, 2012;
1220 Evans; Amyes, 2014).

1221 OXA-11 foi o primeiro exemplo de uma enzima OXA que por mutação
1222 tornou-se uma beta-lactamase de espectro estendido. Além de OXA-11, OXA-13,
1223 OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-19 e OXA-28 apresentam comportamento de ESBLs.
1224 O primeiro grupo de beta-lactamases do tipo OXA resistentes a carbapenêmicos a ser
1225 identificado foi o grupo OXA-23, em *Acinetobacter baumannii* (Evans; Amyes, 2014).

1226 A detecção fenotípica de ESBLs pode ser realizada pela técnica de
1227 duplo sinergismo por disco difusão descrito por Jarlier et al. (1988). Um disco de
1228 antibiótico amoxicilina com ácido clavulânico é posicionado ao centro da placa de ágar
1229 Mueller Hinton (MH). A 30 mm dele são dispostos os discos de beta-lactâmicos das
1230 subclasses monobactâmico (aztreonam), cefalosporinas de terceira geração
1231 (cefotaxima, ceftriaxona) e cefalosporina de quarta geração (cefepime).

1232 A positividade para enzima é determinada pela presença da distorção
1233 da zona de inibição da borda do halo que abrange o disco de ácido clavulânico em
1234 direção a pelo menos um dos outros discos, criando halos fantasmas (Figura 3), sendo
1235 interpretado como sinergia e positivos para a produção de ESBL. O teste fenotípico,
1236 no entanto, não tem a capacidade de diferenciar qual a família de ESBL pertence a
1237 enzima presente na amostra.

Figura 3 – Teste fenotípico de produção de Beta Lactamases tipo Espectro Estendido (ESBL)



Amostra clínica de *Klebsiella* spp. semeada em placa ágar MH com presença de halos fantasmas (distorção de halo).

1238 2.6.8.1.2 Ampicilinase C (AmpC)

1239 A primeira enzima bacteriana envolvida na destruição da penicilina,
 1240 antes mesmo do seu lançamento comercial, foi a Ampicilinase C (AmpC beta-
 1241 lactamase) originária de *E. coli*, embora não tivesse sido assim chamada em 1940
 1242 (Reygert, 2018; Jacoby, 2009). Pertencente a classe molecular C de Ambler de acordo
 1243 com a classificação de beta-lactamases, é uma enzima que desempenha um papel
 1244 significativo na resistência bacteriana aos antibióticos dessa classe (Meini et al., 2019;
 1245 Bonomo, 2017).

1246 A resistência a AmpC pode ser classificada em três categorias. A
 1247 primeira é a resistência cromossômica induzível que surge quando há a presença de
 1248 um beta-lactâmico. A segunda é a resistência cromossômica não induzível devido a
 1249 mutações promotoras e/ou atenuadoras (AmpR) que levam a expressão constante,
 1250 mesmo na ausência de antibióticos (Jacoby, 2009) e a terceira pela presença de
 1251 genes AmpC via plasmídeos (Tamma et al., 2019).

1252 Exemplo de bactérias que apresentam resistência cromossomal
 1253 induzida presença de beta-lactâmico resultando na expressão de AmpC são
 1254 *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas*
 1255 *aeruginosa*. Enquanto *E. coli*, *Shigella species*, *Acinetobacter baumannii* apresentam
 1256 resistência via AmpC pela desrepressão estável devido a mutações nos genes
 1257 reguladores envolvidos com AmpC. AmpCs plasmidiais são comuns também em *E.*

1258 *coli*, *K. pneumoniae*, e *Salmonella* spp. (Tamma et al., 2019), *Proteus mirabilis*, *P.*
1259 *vulgaris* e *Stenotrophomonas* spp. (Munita; Arias, 2016) e são considerados mais
1260 prevalentes que AmpC de origem cromossomal (Bonomo, 2017).

1261 Bactérias Gram-negativas que abrigam genes cromossômicos de
1262 beta-lactamase AmpC tem a expressão mediada pelo regulador AmpR, e geralmente
1263 são constitutivamente expressos em baixo nível. Entretanto, podem ter a expressão
1264 de genes induzida pela presença de beta-lactâmicos, como cefoxitina, cefotetana e
1265 imipenem. Mutações no gene repressor ampD são a causa mais comum de produção
1266 e hiperprodução constitutiva de beta-lactamase AmpC (Polsfuss et al., 2011).

1267 As beta-lactamases AmpC também são conhecidas por sua
1268 capacidade de hidrolisar cefalosporinas, que normalmente são resistentes a outras
1269 beta-lactamases (Gupta; Tak; Mathur, 2014) podendo conferir resistência a
1270 aminopenicilinas (como amoxicilina, ampicilina), cefalosporinas de espectro estreito
1271 (por exemplo, cefazolina, cefalotina, cefamandol e cefuroxima),
1272 oximiinocefalosporinas (cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima e ceftriaxona),
1273 cefamicinas (cefoxitina e cefotetan) e aztreonam (Meini et al, 2019; Bonomo, 2017;
1274 Jacoby, 2009). A cloxacilina e o ácido 3-aminofenilborônico inibem as beta-lactamases
1275 AmpC, entretanto sua atividade não é afetada pelo ácido clavulânico, inibidor de
1276 ESBL, sulbactam e tazobactam (Peter-Getzlaff et al., 2011).

1277 A resistência a Cefoxitina, cefalosporina de segunda geração, pode
1278 ser utilizada como um parâmetro discriminativo para a presença desse gene de
1279 resistência (Figura 4). Entretanto, não é possível diferenciar, por esse método, a
1280 origem cromossomal ou plasmidial (Polsfuss et al., 2011; Liu et al., 2017).

Figura 4 – Teste fenotípico para produção de Ampicilinase C (AmpC).

A.



B.



A. Isolado resistente a Cefoxitina (CFO 30µg), preditivo para presença desse gene.

B. Amostra sensível a Cefoxitina (CFO 30µg), que indica a suscetibilidade do isolado a cefalosporina de 2° geração. Fonte: a autora.

1281 A detecção de *Klebsiella* spp. e *E. coli* produtora de AmpC é
 1282 importante uma vez que os produtores dessa enzima podem parecer suscetíveis a
 1283 cefalosporinas de espectro expandido quando testados inicialmente e resistentes ao
 1284 iniciar o tratamento (Polsfuss et al., 2011).

1285 2.6.8.1.3 Carbapenemases

1286 Os carbapenêmicos, o grupo de antibióticos comumente usados para
 1287 tratar infecções graves (Meletis, 2016), possuem atividade antibacteriana de amplo
 1288 espectro definida por uma molécula de carbapenêmico acoplada a um anel beta-
 1289 lactâmico que confere proteção contra a maioria das beta-lactamases, incluindo MBLs
 1290 e ESBLs (Codjoe & Donkor, 2017). As carbapenemases são um tipo de beta-
 1291 lactamase com capacidade de inativar os carbapenêmicos (Reyes et al., 2020).

1292 Existem diferentes tipos de carbapenemases que estão distribuídas
 1293 na classificação de Ambler de beta-lactamases, nas classes A, B e D, sendo que todas
 1294 compartilham um resíduo de serina no sítio ativo. Carbapenemases da classe A
 1295 hidrolisam ativamente carbapenêmicos, mas não-metallo-beta-lactamases (A e D), e
 1296 podem ser parcialmente inibidos por ácido clavulânico. São pertencentes a essa
 1297 classe enzimas conhecidas como a KPC, IMI (beta-lactamase hidrolisante de
 1298 imipenem) e SME (enzima *Serratia marcescens*) (Lee et al., 2016; De Angelis, 2020).

1299 Carbapenemases pertencem principalmente à classe B das beta-

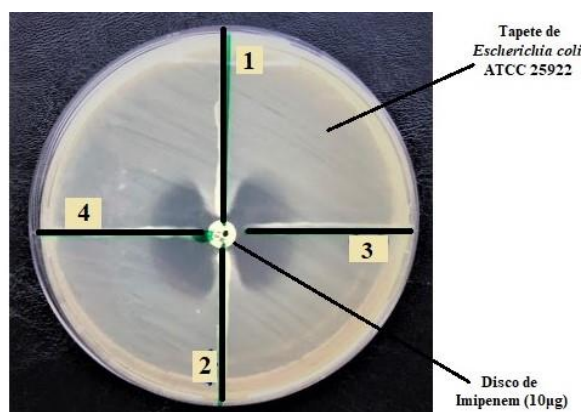
1300 lactamases têm capacidade de hidrolisar carbapenêmicos, mas são suscetíveis à
1301 inibição pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), um quelante de Zn^{2+} e outros
1302 cátions divalentes. O mecanismo de hidrólise depende da interação dos fármacos
1303 beta-lactâmicos com os íons zinco no sítio ativo (Queenan; Bush, 2007).

1304 Enquanto carbapenemases da classe D são serinas-beta-lactamases
1305 do tipo OXA, pouco inibidas por EDTA ou ácido clavulânico, tendo fraca atividade
1306 contra os carbapenêmicos. A classe OXA abrange cerca de 250 enzimas que podem
1307 atuar contra penicilinas, cefalosporinas, cefalosporinas de espectro expandido
1308 (ESBLs do tipo OXA) e carbapenêmicos (carbapenemases do tipo OXA), com
1309 sensibilidade diferente dos inibidores (De Angelis et al., 2020). A principal
1310 preocupação com as carbapenemases OXA é sua capacidade de sofrer mutações
1311 rapidamente e expandir seu espectro de atividade (Codjoe; Donkor, 2017).

1312 As enzimas carbapenemases são tipicamente codificadas por genes
1313 que podem estar presentes em elementos genéticos móveis, como plasmídeos ou
1314 transposons e podem ser facilmente transferidos para outras bactérias (Kopotsa;
1315 Sekyere; Mbelle, 2019).

1316 Testes fenotípicos de detecção de enzimas carbapenemases são fácil
1317 performance e têm capacidade de identificá-las, entretanto, não são capazes de
1318 diferenciá-las (Pasteran et al., 2016). O princípio do Teste de Hodge Modificado (THM)
1319 é a formação de uma zona de aprimoramento (efeito "*fishtail*") em direção à cepa
1320 sensível que indica a produção de carbapenemases (CLSI, 2015) (Figura 5). Isso
1321 ocorre porque a enzima produzida pela cepa suspeita é capaz de inativar o imipenem
1322 ao redor do disco, permitindo que a cepa sensível cresça mais perto do que o normal
1323 (Pasteran et al., 2016).

Figura 5 – Teste de Hodge Modificado em uma placa de ágar Mueller-Hinton.



Amostra 1: controle positivo.

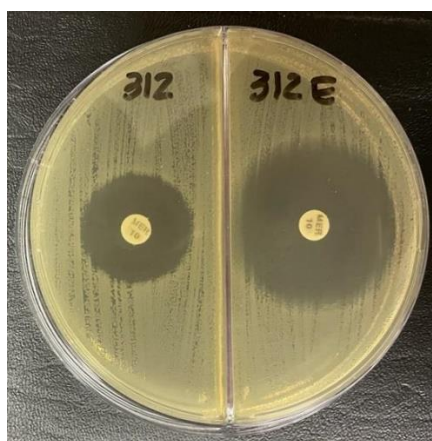
Amostra 2: amostra clínica, apresentando distorção do halo, indicando presença de carbapenemase.

Amostra 3: controle negativo.

Amostra 4: amostra clínica, sem distorção, indicando ausência da enzima.

1324 Já o teste de inativação da carbapenemases modificado (mCIM)
 1325 consiste na hidrólise do princípio ativo do antibacteriano em contato com a
 1326 carbapenemases (Tsai et al., 2020). Para isso, é necessário o contato da bactéria em
 1327 suspensão com o carbapenêmico. Quando positivo, pode-se interpretar a presença
 1328 de uma carbapenemase do tipo serina-beta-lactamase (SBL) ou metalo-beta-
 1329 lactamase (MBL). Seguindo o mesmo princípio do mCIM, o método de inativação de
 1330 carbapenemase por EDTA (eCIM) busca detectar a presença de carbapenemases por
 1331 hidrólise do carbapenêmico em contato com a enzima presente na amostra. É
 1332 adicionado à solução EDTA, que funciona como quelante de zinco, ligando-se ao sítio
 1333 ativo da MBL, tornando-a inativa (Figura 6) (Rizvi et al., 2021; Tsai et al., 2020).

Figura 6 – Método da inativação da carbapenemase modificado (mCIM) e Método de inativação de carbapenemase por EDTA (eCIM).



Deteção de carbapenemases pelo método mCIM (ao lado esquerdo da placa) e eCIM (ao lado

direito da placa). Em mCIM, ausência da inibição do crescimento, halo com diâmetro de 6mm a 15mm ou halo com 16 a 18mm e presença de pequenas colônias dentro da zona de inibição indicam presença da carbapenemase. Diferença de 5mm do halo no eCIM em comparação com mCIM foi considerado como positivo para presença de carbapenemase tipo metalo-beta-lactamase.

1334 Nos últimos anos, há a crescente emergência global e disseminação
1335 de CRE. Essa resistência pode ser atribuída à produção de carbapenemases ou a
1336 uma combinação de mecanismos, incluindo a presença de várias ESBLs e/ou AmpC
1337 juntamente com a perda de porinas e bombas de efluxo (Reyes et al., 2020). Infecções
1338 por esses microrganismos estão associadas com um alto risco de falha clínica e uma
1339 mortalidade de 20 a 40% (De Angelis et al., 2020) e tornaram-se uma grande
1340 preocupação de saúde devido à sua transmissão global, bem como à disponibilidade
1341 limitada de opções viáveis de tratamento para infecções.

1342 2.6.9 Resistência Por Biofilme

1343 O biofilme é uma estrutura imóvel criada por microrganismos que
1344 crescem e aderem a uma superfície viva ou não viva, formando uma matriz de
1345 substâncias poliméricas extracelulares (EPS), DNA extracelular e proteínas
1346 amilogênicas (Sharma; Misba; Khan, 2019; Donlan, 2001). Essa estrutura organizada
1347 proporciona uma barreira física e química ao meio externo, o que não permite que a
1348 molécula antibacteriana acesse seu local de ação (Pinto et al., 2020). Além de
1349 proteção contra uma vasta gama de antibacterianos, biofilmes têm a capacidade de
1350 proteção contra radiação ultravioleta de alta intensidade, alta ou baixa temperatura,
1351 diferenças de pH e osmolaridade, alta pressão, falta de nutrientes, além de forças
1352 mecânicas, e até células da imunidade do hospedeiro, além da própria interação
1353 química entre o desinfetante e o próprio biofilme, propiciando a sobrevivência de
1354 microrganismos em ambientes inóspitos (McDonnell et al., 1999; Yin et al., 2019).

1355 A atividade metabólica das comunidades de biofilme bacteriano é
1356 diferente em comparação com bactérias livres na taxa de crescimento, transcrição,
1357 tradução e na densidade celular de comunidades bacterianas heterogêneas (Sharma;
1358 Misba; Khan, 2019). As alterações fisiológicas devido a expressão gênica diferente
1359 dentro de um biofilme podem levar ao desenvolvimento de fenótipos resistentes a
1360 antibacterianos (Roy et al., 2018; Khan et al., 2021), uma vez que pode incluir a
1361 regulação positiva das bombas de efluxo ou a formação de células persistentes, que
1362 são dormentes, e altamente tolerantes a antibióticos (Khan et al., 2021; Hajiagha;

1363 Kafil, 2023). A diminuição da atividade metabólica, que pode evoluir até uma fase
1364 estacionária, os torna menos suscetíveis a agentes antibacterianos que visam células
1365 em divisão ativa (Roy et al., 2018).

1366 Os microrganismos constituintes dos biofilmes utilizam *quorum sense*,
1367 um mecanismo de comunicação entre bactérias, para coordenar seu comportamento
1368 e regular expressão gênica de acordo com as mudanças de densidade celular em uma
1369 população e, conseqüentemente, a produção de EPS (Roy et al., 2018). A formação
1370 de biofilme Gram-negativas utiliza acil homosserina lactona como uma molécula de
1371 sinal regulada para detecção do *quorum sense* (Khan et al., 2021).

1372 Além disso, os biofilmes são altamente heterogêneos. Essa
1373 diversidade permite que os microrganismos sobrevivam em diversas condições e se
1374 adaptem a estresses ambientais (Chen; Wang; Lee, 2021; Hajiagha; Kafil, 2023).
1375 Dentro de um biofilme, por exemplo, subpopulações com maior resistência a
1376 antibacterianos podem fornecer proteção a menos resistentes. Isso porque biofilmes
1377 servem como um reservatório para genes de resistência, uma vez que permite que as
1378 bactérias compartilhem genes por transferência horizontal (Ren et al., 2018).

1379 A resistência de microrganismos dentro de biofilmes apresenta
1380 desafios significativos, como infecções associadas à assistência à saúde e sistemas
1381 ambientais (Rather; Gupta; Mnadal, 2021). As estratégias para combater a resistência
1382 associada ao biofilme incluem o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos
1383 que podem penetrar na matriz EPS, interrupção da sinalização de detecção de
1384 *quorum sense* e o uso de métodos físicos ou químicos para remover ou prevenir a
1385 formação de biofilme nas superfícies (Shrestha et al., 2022).

1386 2.7 DETECÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE BETA-LACTAMASES

1387 A detecção de enzimas beta-lactamases permite a implementação de
1388 tratamento correto e o monitoramento da disseminação da resistência antibacteriana
1389 em ambientes hospitalares e comunitários (Yamin et al., 2023). Entretanto, a
1390 diversidade e a rápida evolução dessas enzimas, além das limitações de sensibilidade
1391 e especificidade em alguns testes, associados a disponibilidade e aos custos
1392 interferem na capacidade diagnóstica (Rentschler; Kaiser; Deigner, 2021).

1393 Testes tradicionais baseados em cultura são recomendados pelo
1394 Comitê brasileiro e europeu de testes de suscetibilidade antimicrobiana e pelo Instituto

1395 de Padrões Clínicos e Laboratoriais (BrCast, 2021; CLSI, 2015; 2022; EuCast 2022).
1396 Testes com essa abordagem determinam se uma bactéria se multiplica quando um
1397 antibacteriano é adicionado e em quais doses são eficazes. Entretanto, não tem
1398 capacidade de indicar o mecanismo de resistência presente. Antibiogramas
1399 tradicionais, como difusão em disco, micro diluição em caldo, testes de gradiente,
1400 testes de ponto de ruptura e diluição em ágar são exemplos desses testes, e
1401 dependem da exposição de isolados bacterianos viáveis aos antibacterianos para
1402 detectar crescimento visualmente (Yamin et al., 2023).

1403 Testes fenotípicos específicos para detecção de ESBL, AmpC e
1404 carbapenemases já foram descritos (Jarlier et al., 1988; Peter-Getzlaff et al., 2011,
1405 CLSI, 2015, Rizvi et al., 2021; Tsai et al., 2020). Entretanto, embora específicos no
1406 tipo de degradação antibacteriana esperada, podem não detectar variantes mais
1407 recentes, e são incapazes de identificar a presença de genes específicos, além da
1408 possibilidade de resultar em falsos negativos ou positivos devido à interpretação
1409 subjetiva das zonas de restrição e a interferências ambientais tais como temperatura
1410 e pH (Perera et al., 2023).

1411 Ainda, testes avançados baseados em cultura, como Vitek 2 System,
1412 BD Phoenix e MicroScan são plataforma automatizadas com capacidade para realizar
1413 simultaneamente múltiplos testes em intervalos menores do que os de cultura
1414 tradicionais (4–10 h), reduzem o tempo de trabalho manual e melhoram a
1415 padronização, além tem capacidade de sinalizar padrões de resistência bacteriana.
1416 Entretanto, são demandam equipamentos e reagentes específicos e equipe treinada
1417 (Shanmugakani et al., 2020, Vasala; Hytönen; Laitinen, 2020).

1418 As técnicas de base molecular têm vantagens sobre os ensaios
1419 fenotípicos na detecção genes de resistência a antibióticos, como capacidade de
1420 amplificar genes de culturas não cultiváveis ou microrganismos mortos e de detecção
1421 de mais de um gene por vez (multiplex) (Galhano et al., 2021), além de fornecem uma
1422 detecção rápida e sensível de genes de resistência (Yamin et al., 2023). No entanto,
1423 técnicas de base molecular tem limitações em termos de capacidade de detecção de
1424 resistências desconhecidas ou novas e da sua dependência da disponibilidade de
1425 primers específicos para genes alvo, o que torna uma alternativa custosa, além da
1426 incapacidade de determinar concentrações inibitórias mínimas (Rohde et al., 2017).

1427 A integração de métodos fenotípicos e genotípicos é frequentemente
1428 necessária para uma caracterização completa e precisa da resistência beta-lactâmica.

1429 2.8 BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO NO MUNDO E BRASIL

1430 Estudos sobre o possível compartilhamento de cepas ESBL/AmpC e
1431 carbapenemases entre animais de companhia saudáveis ou doentes e humanos com
1432 alto grau de convívio também já foram relatados (Verkola et al., 2019; Palmeira et al.,
1433 2021; Da Silva et al., 2022; Vásquez-Ponce et al., 2022; Menezes et al., 2021).

1434 Relatos de detecção fenotípica e genotípica de ESBL e
1435 carbapenemases em *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. em animais de companhia
1436 são descritos na África (Yousfi et al., 2016; El-Tarabile et al., 2022; Matos et al., 2023),
1437 América do Norte (Elias et al., 2019; Ortiz et al., 2022), Europa (Bogaerts et al., 2015;
1438 Peterhans et al., 2018; Reynolds et al., 2019; Abreu-Salinas et al., 2020; Piccolo et al.,
1439 2020; Carvalho et al., 2021; Garcia-Fierro et al., 2022; Haenni et al., 2022; Johansson
1440 et al., 2022; Thomson et al., 2022; Aurich et al., 2024) e Ásia (Liu; Kuan; Yeh, 2021;
1441 Kwon et al., 2022; Shin et al., 2021).

1442 Relatos de beta-lactamases de *Enterobacteriaceae* em animais de
1443 produção também são amplamente documentados em diferentes localidades da África
1444 (Montso et al., 2019; Hamza et al., 2020), Ásia (Sivaranam et al., 2020; Chinnam et al.,
1445 2021; He et al., 2021; Yang et al., 2021; Kamala; Sivaperumal, 2023), Europa (Amador
1446 et al., 2019; Velasova et al., 2019; Plassard et al., 2021; Athanasakopoulou et al.,
1447 2021; Homeier-Bachmann, et al., 2022; Gonzalez et al., 2022; Tello et al., 2022) e
1448 Oceania (Burgess et al., 2021; Melesse et al., 2022).

1449 No Brasil, estudos recentes têm documentado o isolamento de
1450 *Enterobacteriaceae* com produção de ESBL e carbapenemases nos estados do
1451 Paraná, Santa Catarina, Bahia, São Paulo e Minas Gerais (Ishii et al., 2011; Sfaciotte
1452 et al., 2021; Santos et al., 2021; Sartori et al., 2019; 2020; Salgado-Caxito et al., 2021;
1453 Silva et al., 2024) em cães e gatos acometidos por infecção bacteriana. A presença
1454 dos genes responsáveis por essa produção é descrita no Sudeste (Melo et al., 2018;
1455 Sella et al., 2018; 2020a, 2021) e Nordeste (Silva et al., 2022).

1456 Em animais de produção, tanto em amostras de fezes, esfregaços de
1457 pele e leite, há relatos de isolamento de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL e
1458 carbapenemases em diferentes estados do Brasil, incluindo São Paulo, Bahia, Minas
1459 Gerais, Goiás, Paraná e Pernambuco (Sartori et al., 2017; Mainardi et al., 2020;
1460 Nobrega et al., 2021; Campos et al., 2022; Sierra et al., 2023). A detecção fenotípica
1461 dessas enzimas em peixes também foi documentada, no estado do Ceará (Almeida

1462 et al., 2017).

1463 Relatos em aves de produção também são encontrados na literatura
1464 científica, abrangendo diferentes localidades globais como a Alemanha (Laube et al.,
1465 2013), Egito (Hazam; Dorgham; Hazam, 2016), Finlândia (Paivarinta et al., 2020),
1466 Suécia (Nilsson et al., 2020), Malásia (Tan et al., 2023), e no Brasil (Lentz et al., 2020;
1467 Gazal et al., 2021; Patricio et al., 2022; Menck-Costa et al., 2022).

1468 **3 REFERÊNCIAS**

- 1469 ABREU-SALINAS, F. *et al.* High Prevalence and Diversity of Cephalosporin-
1470 Resistant *Enterobacteriaceae* Including Extraintestinal Pathogenic *E. coli* CC648
1471 Lineage in Rural and Urban Dogs in Northwest Spain. **Antibiotics**, vol. 9, n. 8, p. 468,
1472 ago. 2020.
- 1473
- 1474 ABUSHAHEEN, M. A. *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical
1475 significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, jun. 2020.
- 1476
- 1477 AL-DAHMOUSHI, H.; ALI, S. A.; AL-KHAFAJI, N. Efflux Pumps among Urinary *E. coli*
1478 and *K. pneumoniae* Local Isolates in Hilla City, Iraq. *In: The Global Antimicrobial*
1479 **Resistance Epidemic**, Rijeka: IntechOpen, 2022, v. 1, c. 14., 264p.
- 1480
- 1481 ALABDULADHEM, T.O.; BORDONI, B. Physiology, Krebs Cycle. [Updated 2022 Nov
1482 23]. *In: StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024
1483 Jan. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556032/>. Acesso em: 6
1484 mai. 2024.
- 1485
- 1486 ALBERTS B. *et al.* DNA Replication Mechanisms. *In: ALBERTS B. et al. Molecular*
1487 **Biology of the Cell**. 4 ed. Nova York: Garland Science; 2002a. Disponível em: .
1488 Acesso em: 3 mai. 2024.
- 1489
- 1490 ALBERTS B. *et al.* From DNA to RNA. *In: ALBERTS B. et al. Molecular Biology of*
1491 **the Cell**. 4 ed. Nova York: Garland Science; 2002b. Disponível em:
1492 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26887/>. Acesso em: 3 mai. 2024.
- 1493
- 1494 ALBERTS B. *et al.* From RNA to Protein. *In: ALBERTS B. et al. Molecular Biology of*
1495 **the Cell**. 4 ed. Nova York: Garland Science; 2002c. Disponível em:
1496 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26829/>. Acesso em: 3 mai. 2024.
- 1497
- 1498 ALENAZY, R. Drug Efflux Pump Inhibitors: A Promising Approach to Counter Multidrug
1499 Resistance in Gram Negative Pathogens by Targeting AcrB Protein from AcrAB-TolC
1500 Multidrug Efflux Pump from *Escherichia coli*. **Biology (Basel)**, vol. 11, n. 9, p. 1328,
1501 set. 2022.
- 1502
- 1503 ALMEIDA, M. V. A. *et al.* Drug resistance, AmpC- β -lactamase and extended-spectrum
1504 β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from fish and shrimp **Revista do**
1505 **Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**. v. 59, e70, nov. 2017.
- 1506
- 1507 AMADOR, P. *et al.* Prevalence of Antibiotic Resistance Genes in Multidrug-
1508 Resistant *Enterobacteriaceae* on Portuguese Livestock Manure. **Antibiotics**, vol. 8, n.
1509 1, p. 23, mar. 2019.
- 1510
- 1511 AMBLER, R. P. *et al.* A standard numbering scheme for the class A beta-
1512 lactamases. **The Biochemical journal**, v. 276, Pt 1, p. 269–270, mai. 1991.
- 1513
- 1514 AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for
1515 the future. **Frontiers in Microbiology**, vol. 1, n. 134, dez. 2010.

- 1516 ANDERSON, E. S.; N. DATTA. Resistance to penicillins and its transfer in
1517 *Enterobacteriaceae*. **Lancet**, vol. 1, n. 7382, p. 407-9, fev. 1965.
1518
- 1519 ATHANASAKOPOULOU, Z. *et al.* Antimicrobial Resistance Genes in ESBL-
1520 Producing *Escherichia coli* Isolates from Animals in Greece. **Antibiotics**, vol. 10, n. 4,
1521 p. 389, abr. 2021.
1522
- 1523 AURICH, S. *et al.* Genotypic Characterization of Uropathogenic *Escherichia coli* from
1524 Companion Animals: Predominance of ST372 in Dogs and Human-Related ST73 in
1525 Cats. **Antibiotics**, vol. 13 n. 1, p. 38, jan. 2024.
1526
- 1527 AYUKEKBONG, J. A.; NTEMGWA, M.; ATABE, A. N. The threat of antimicrobial
1528 resistance in developing countries: Causes and control strategies. **Antimicrobial**
1529 **Resistance and Infection Control**, vol. 6, n. 47, mai. 2017.
1530
- 1531 BAIER, F.; TOKURIKI, N. Connectivity between catalytic landscapes of the metallo- β -
1532 lactamase superfamily. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 13, p. 2442–2456,
1533 jun. 2014.
1534
- 1535 BALABAN, N. Q. *et al.* Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence.
1536 **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 7, p. 441–448, jul. 2019.
1537
- 1538 BASSETT, E. J. *et al.* Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia
1539 (A.D. 350). **Science**, v. 209, n. 4464, p. 1532–1534, set. 1980.
1540
- 1541 BEBRONE, C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization,
1542 structure, zinc coordination) and their superfamily. **Biochemical pharmacology**, v.
1543 74, n. 12, p. 1686–1701, jun. 2007.
1544
- 1545 BENARROCH, J. M.; ASALLY, M. The Microbiologist's Guide to Membrane Potential
1546 Dynamics. **Trends in microbiology**, vol. 28, n. 4, p. 304-314, abr. 2020.
1547
- 1548 BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of
1549 antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal of Pharmacology**, v. 153,
1550 Suppl 1(Suppl 1), mar. 2008.
1551
- 1552 BENTLEY, R.; BENNETT, J. W. What Is an Antibiotic?. **Advances in applied**
1553 **microbiology**, vol. 52, p. 303-31, 2003.
1554
- 1555 BHARATHAM, N. *et al.* Structure and function relationship of OqxB efflux pump from
1556 *K. pneumoniae*. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 5400, set. 2021.
1557
- 1558 BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews**
1559 **Microbiology**, vol. 13, n. 1, p. 42-51, jan. 2015.
1560
- 1561 BLAIR, J. M. A.; RICHMOND, G. E.; PIDDOCK, L. J. V. Multidrug efflux pumps in Gram
1562 negative bacteria and their role in antibiotic resistance. **Future Microbiology**, vol. 9,
1563 n. 10, p. 1165-77, out. 2014.
1564
- 1565 BOBATE, S. Emergence of environmental antibiotic resistance: Mechanism,

- 1566 monitoring and management. **Environmental Advances**, vol. 13, n. 100409, out. 2023
1567
- 1568 BOGAERTS, P. *et al.* Characterization of ESBL- and AmpC-producing
1569 *Enterobacteriaceae* from diseased companion animals in Europe. **Microbial Drug**
1570 **Resistance**, v. 21, n. 6, p. 643–650, dez. 2015.
1571
- 1572 BONOMO, R. A. β -Lactamases: A focus on current challenges. **Cold Spring Harbor**
1573 **Perspectives in Medicine**, vol. 7, n. 1, p. a025239, jan. 2017.
1574
- 1575 BORODOVICH, T. *et al.* Phage-mediated horizontal gene transfer and its implications
1576 for the human gut microbiome. **Gastroenterology report**, vol. 10, n. goac012, abr.
1577 2022.
1578
- 1579 BrCAST. Cutoff point tables for interpreting MICs and halo diameters. **Guidance**
1580 **Documents**. (2021). Disponível em: <https://brcast.org.br/documentos/documentos-3/>.
1581 Acessado em 15 Dezembro 2022.
1582
- 1583 BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of Gram-negative bacteria to
1584 current antibacterial agents and approaches to resolve it. **Molecules (Basel,**
1585 **Switzerland)**, vol. 25, n. 6, p. 1340, mar. 2020.
1586
- 1587 BRENNAN-KROHN, T. *et al.* New strategies and structural considerations in
1588 development of therapeutics for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*.
1589 **Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine**, vol. 220,
1590 p. 14-32, jun. 2020.
1591
- 1592 BROOKS, L. R. K.; MIAS, G. I. *Streptococcus pneumoniae*'s Virulence and Host
1593 Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. **Frontiers in immunology**, v. 9, n.
1594 1366, jun. 2018.
1595
- 1596 BRUNEL, J. Antibiosis from Pasteur to Fleming. **Journal of the history of medicine**
1597 **and allied sciences**, vol. 6, n. 3, p. 287-301, 1951.
1598
- 1599 BUCKEL, W. Energy Conservation in Fermentations of Anaerobic Bacteria. **Frontiers**
1600 **in microbiology**, vol. 12, n. 703525, set. 2021.
1601
- 1602 BURGESS, S. A. *et al.* The epidemiology of AmpC-producing *Escherichia coli* isolated
1603 from dairy cattle faeces on pasture-fed farms. **Journal of medical microbiology**, vol.
1604 70, n. 10, p. 001447, out. 2021.
1605
- 1606 BUSH, K. Past and present perspectives on β -lactamases. **Antimicrobial agents and**
1607 **chemotherapy**, vol. 62, n. 10, p. e01076-18, set. 2018.
1608
- 1609 BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. **Cold**
1610 **Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 8, 1 ago. 2016.
1611
- 1612 BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Epidemiology of β -Lactamase-Producing
1613 Pathogens. **Clinical microbiology reviews**, vol. 33, n. 2, p. e00047-19, Fev. 2020.
1614
- 1615 BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases.

- 1616 **Antimicrobial agents and chemotherapy**, vol. 54, n. 3, p. 969-76, mar. 2010.
- 1617
- 1618 BYWATER, R. J. Veterinary Use of Antimicrobials and Emergence of Resistance in
1619 Zoonotic and Sentinel Bacteria in the EU. **Journal of veterinary medicine. B,**
1620 **Infectious diseases and veterinary public health**, vol. 51, n. 8-9, p. 361-3, out. 2024
- 1621
- 1622 CAMPBELL, E. A. *et al.* Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna
1623 polymerase, **Cell**, vol. 104, n. 6, p. 901-12, mar, 2001.
- 1624
- 1625 CAMPOS, F. C *et al.* Genetic and Antimicrobial Resistance Profiles of Mammary
1626 Pathogenic *E. coli* (MPEC) Isolates from Bovine Clinical Mastitis. **Pathogens**, vol. 11,
1627 n. 12, p. 1435, nov. 2022.
- 1628
- 1629 CANESCHI, A. *et al.* The Use of Antibiotics and Antimicrobial Resistance in Veterinary
1630 Medicine, a Complex Phenomenon: A Narrative Review. **Antibiotics**, vol. 12, n. 3, p.
1631 487, mar. 2023.
- 1632
- 1633 CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M enzymes: Origin and
1634 diffusion. **Frontiers in Microbiology**, vol. 3, n. 110, abr. 2012.
- 1635
- 1636 CARD. Comprehensive Antibiotic Research Database. Disponível em: <>. Acesso em:
1637 05/01/2024.
- 1638
- 1639 CARDOSO, M. Antimicrobial use, resistance and economic benefits and costs to
1640 livestock producers in Brazil. **OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers**, n. 135
1641 2019.
- 1642
- 1643 CARUANA, J. C.; WALPER, S. A. Bacterial Membrane Vesicles as Mediators of
1644 Microbe – Microbe and Microbe – Host Community Interactions. **Frontiers in**
1645 **microbiology**, vol. 11, n. 432, mar. 2020.
- 1646
- 1647 CARVALHO, I. *et al.* Antimicrobial Resistance Genes and Diversity of Clones among
1648 Faecal ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Healthy and Sick Dogs Living
1649 in Portugal. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, vol. 10, n. 8, p. 1013, ago. 2021.
- 1650
- 1651 CASEY, A. K.; ORTH, K. Enzymes Involved in AMPylation and deAMPylation.
1652 **Chemical reviews**, vol. 118, n. 3, p. 1199-1215, 2018.
- 1653
- 1654 CASJENS, S.; WEIGELE, P. DNA Packaging by Bacteriophage P22. *In: Madame*
1655 **Curie Bioscience Database** [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-
1656 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6430/>. Acesso: 18 mai
1657 2023.
- 1658
- 1659 CAVAILLON, J. M.; LEGOUT, S. Louis Pasteur: Between Myth and Reality.
1660 **Biomolecules**, vol. 12, n. 4, p. 596, abr. 2022.
- 1661
- 1662 CHATTERJEE, S. *et al.* *Acinetobacter baumannii* transfers the bla_{NDM-1} gene via
1663 outer membrane vesicles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 8, p.
1664 2201–2207, ago. 2017.
- 1665

- 1666 CHAUDHRY R.; VARACALLO M. Biochemistry, Glycolysis. [Updated 2023 Aug 8]. *In:*
1667 **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024
1668 Jan. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482303/>. Acesso em: 10
1669 mai. 2024.
- 1670
1671 CHAWLA, M. *et al.* Antibiotic Potentiators Against Multidrug-Resistant Bacteria:
1672 Discovery, Development, and Clinical Relevance. **Frontiers in microbiology**, vol. 13,
1673 n. 887251, Jul. 2022.
- 1674
1675 CHEN, C. W. *et al.* Binding and Action of Triphenylphosphonium Analog of
1676 Chloramphenicol upon the Bacterial Ribosome. **Antibiotics**, vol. 10, n. 4, p. 390, abr.
1677 2021.
- 1678
1679 CHEN, J.; MORITA, T.; GOTTESMAN, S. Regulation of Transcription Termination of
1680 Small RNAs and by Small RNAs: Molecular Mechanisms and Biological Functions.
1681 **Frontiers in cellular and infection microbiology**, vol. 9, n. 201, jun. 2019.
- 1682
1683 CHEN, L.; WANG, X. D.; LEE, D. J. Biofilm with highly heterogeneous interior structure
1684 for pollutant removal: Cell distribution and manipulated mass transport. **Bioresource**
1685 **technology**, vol. 343, n. 125913, 2022.
- 1686
1687 CHIANG, Y. N.; PENADÉS, J. R.; CHEN, J. Genetic transduction by phages and
1688 chromosomal islands: The new and noncanonical. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 8, ago.
1689 2019.
- 1690
1691 CHINNAM, B. K. *et al.* Detection of b-Lactamase-producing *Proteus mirabilis* strains
1692 of animal origin in Andhra Pradesh, India and Their Genetic Diversity. **Journal of Food**
1693 **Protection**, v. 84, n. 8, p. 1374–1379, ago. 2021.
- 1694
1695 CHUKWUDI, C. U. rRNA Binding Sites and the Molecular Mechanism of Action of the
1696 Tetracyclines. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4433–4441,
1697 ago. 2016.
- 1698
1699 CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J.; MCGEHEE, M. R. Plasmids. *In:* Clark, D.P.;
1700 Pazdernik, N.J.; McGehee, M. R. **Molecular Biology**. Academic Cell, Cambridge MA,
1701 USA, 2019, p. 712–48.
- 1702
1703 CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentyfifth
1704 informational supplement. **CLSI Document M100-S25**. 32 ed. Wayne, PA: Clinical and
1705 Laboratory Standards Institute, 2015.
- 1706
1707 CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **CLSI**
1708 **supplement M100**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA: Clinical
1709 and Laboratory Standards Institute, 2022.
- 1710
1711 COCULESCU, B. I. Antimicrobial resistance induced by genetic changes. **Journal of**
1712 **medicine and life**, vol. 2, n. 2, p. 114-23, abr-jun. 2009.
- 1713
1714 CODJOE, F. S.; DONKOR, E. S. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical**
1715 **sciences (Basel, Switzerland)**, vol. 6, n. 1, p.1, dez. 2017.

- 1716 COOPER, G. M. **The Cell: A Molecular Approach**. 2 Ed. Sunderland (MA): Sinauer
1717 Associates; 2000. DNA Replication. Disponível em:
1718 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9940/>. Acesso em: 2 fev. 2024.
1719
- 1720 COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins,
1721 challenges and solution. **International journal of medical microbiology**, vol. 303, n.
1722 6-7, p. 287-92, ago. 2013.
1723
- 1724 CUI, Y. *et al.* Production of Gamma-Aminobutyric Acid from Lactic Acid Bacteria: A
1725 Systematic Review. **International journal of molecular sciences**, vol. 21, n. 3, p.
1726 995, fev. 2020.
1727
- 1728 D'COSTA, V. M. *et al.* Sampling the antibiotic resistome. **Science**, v. 311, n. 5759, p.
1729 374–377, jan. 2006.
1730
- 1731 DA SILVA, L. C. B. A. *et al.* Human pandemic K27-ST392 CTX-M-15 extended-
1732 spectrum β -lactamase-positive *Klebsiella pneumoniae*: A one health clone threatening
1733 companion animals. **One Health**, vol. 15, n. 100414, jul. 2022.
1734
- 1735 DARBY, E. M. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. **Nature**
1736 **reviews. Microbiology**, vol. 21, n. 5, p. 280-295, mai. 2023.
1737
- 1738 DAS, B. *et al.* Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of
1739 resistance genes and mechanisms. **Vaccine**, vol. 38, Suppl 1, p. A83-A92, fev. 2020.
1740
- 1741 DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology**
1742 **and molecular biology reviews**, vol. 74, n. 3, p. 417-33, set. 2010.
1743
- 1744 DE ANGELIS, G. *et al.* Molecular mechanisms, epidemiology, and clinical importance
1745 of β -lactam resistance in *Enterobacteriaceae*. **International Journal of Molecular**
1746 **Sciences**, vol. 21, n. 14, p. 5090, jul. 2020.
1747
- 1748 DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica**
1749 **et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, vol. 1794, n. 5, p. 808-16, mai. 2009.
1750
- 1751 DEPARDIEU, F. *et al.* Modes and modulations of antibiotic resistance gene
1752 expression. **Clinical microbiology reviews**, vol. 20, n. 1, p. 79-114, jan. 2007.
1753
- 1754 DEWAR, J. M.; WALTER, J. C. Mechanisms of DNA replication termination. **Nature**
1755 **reviews. Molecular cell biology**, v. 18, n. 8, p. 507–516, ago. 2017.
1756
- 1757 DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History
1758 and Mode of Action. **Poultry science**, vol. 84, n. 4, p. 634-43, abr. 2005.
1759
- 1760 DINOS, G. P. The macrolide antibiotic renaissance. **British Journal of**
1761 **Pharmacology**, vol. 174, n. 18, p. 2967-2983, set. 2017.
1762
- 1763 DOLEJSKA, M. *et al.* Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the
1764 carbapenemase NDM-1, the ArmA 16s RNA methylase and a resistance-nodulation-
1765 cell division/multidrug efflux pump. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68,

- 1766 n. 1, p. 34–39, jan. 2013.
1767
- 1768 DÖNHÖFER, A. *et al.* Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance.
1769 **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**
1770 **America**, v. 109, n. 42, p. 16900–16905, out. 2012.
1771
- 1772 DONLAN, R. M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological
1773 Process, **Clinical Infectious Diseases**, vol. 33, n. 8, p. 1387–1392, out. 2001.
1774
- 1775 DOUTHWAITE, S. *et al.* The tylosin-resistance methyltransferase RlmAII (TlrB)
1776 modifies the N-1 position of 23 S rRNA nucleotide G748. **Journal of Molecular**
1777 **Biology**, v. 337, n. 5, p. 1073–1077, abr. 2004.
1778
- 1779 DU, D. *et al.* Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. **Nature**, v. 509, n.
1780 7501, p. 512–515, 2014.
1781
- 1782 EGOROV, A. M.; ULYASHOVA, M. M.; RUBTSOVA, M. Y. Bacterial Enzymes and
1783 Antibiotic Resistance. **Acta naturae**, v. 10, n. 4, p. 33–48, out. 2018.
1784
- 1785 EIAMPHUNGORN, W. *et al.* Tackling the Antibiotic Resistance Caused by Class A β -
1786 Lactamases through the Use of β -Lactamase Inhibitory Protein. **International journal**
1787 **of molecular sciences**, vol. 19, n. 8, p. 2222, ago. 2018.
1788
- 1789 EL-TARABILI, R. M. *et al.* Prevalence, antibiotic profile, virulence determinants,
1790 ESBLs, and non- β -lactam encoding genes of MDR *Proteus* spp. isolated from infected
1791 dogs. **Frontiers in genetics**, vol. 13, n. 952689, out. 2022.
1792
- 1793 ELIAS, L. *et al.* The Occurrence and Characterization of Extended-Spectrum-Beta-
1794 Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Clinical Diagnostic Specimens of
1795 Equine Origin. **Animals**, vol. 10, n. 1, p. 28, dez. 2019.
1796
- 1797 ELIOPOULOS, G. M.; HUOVINEN, P. Resistance to Trimethoprim-
1798 Sulfamethoxazole, **Clinical Infectious Diseases**, vol. 32, n. 11, p. 1608–1614, jun.
1799 2001.
1800
- 1801 EMMERICH, R.; LÖW, O. Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen
1802 Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. **Zeitschrift für**
1803 **Hygiene**, v. 31, p. 1–65, dez. 1899.
1804
- 1805 ENRIGHT, M. C. *et al.* The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus*
1806 *aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United**
1807 **States of America**, vol. 99, n. 11, p. 7687–92, mai. 2002.
1808
- 1809 ERMOLENKO, D. N.; NOLLER, H. F. mRNA translocation occurs during the second
1810 step of ribosomal intersubunit rotation. **Nature structural & molecular biology**, v. 18,
1811 n. 4, p. 457–462, abr. 2011.
1812
- 1813 EuCAST. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease. **Guidance**
1814 **Documents**. Disponível em: <https://www.eucast.org/newsiandr>. Acessado em 08
1815 setembro 2022.

- 1816 EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. OXA β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**,
1817 v. 27, n. 2, p. 241–263, abr. 2014.
- 1818
- 1819 EVERETT M. *et al.* Discovery of a Novel Metallo- β -Lactamase Inhibitor That
1820 Potentiates Meropenem Activity against Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*.
1821 **Antimicrobial agents and chemotherapy**, vol. 62, n. 5, e00074-18, abr. 2018.
- 1822
- 1823 FAJARDO, A. *et al.* The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. **PLoS**
1824 **ONE**, v. 3, n. 2, fev. 2008.
- 1825
- 1826 FAVROT, L.; BLANCHARD, J. S.; VERGNOLLE, O. Bacterial GCN5-Related N-
1827 Acetyltransferases: From Resistance to Regulation. **Biochemistry**, v. 55, n. 7, p. 989–
1828 1002, fev. 2016.
- 1829
- 1830 FEEHILY, C.; KARATZAS, K. A. G. Role of glutamate metabolism in bacterial
1831 responses towards acid and other stresses. **Journal of applied microbiology**, vol.
1832 114, n. 1, p. 11-24, jan. 2013.
- 1833
- 1834 FERNANDO, D. M.; KUMAR, A. Resistance-Nodulation-Division multidrug efflux
1835 pumps in Gram negative bacteria: Role in virulence. **Antibiotics (Basel,**
1836 **Switzerland)**, vol. 2, n. 1, p. 163-81, mar. 2013.
- 1837
- 1838 FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special
1839 reference to their use in the isolation of B. influenzae. **Bulletin of the World Health**
1840 **Organization**, vol. 79, n. 8, p. 780-90, 1929.
- 1841
- 1842 FLENSBURG, J.; SKOLD, O. Massive overproduction of dihydrofolate reductase in
1843 bacteria as a response to the use of trimethoprim. **European journal of**
1844 **biochemistry**, vol. 162, n. 3, p 473-6, fev. 1987.
- 1845
- 1846 FORSBERG, K. J. *et al.* The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human
1847 pathogens. **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1107–1111, ago. 2012.
- 1848
- 1849 FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and**
1850 **Public Health**, vol. 10, n. 4, p. 369-378, jul-ago. 2017.
- 1851
- 1852 GALHANO, B. S. P. *et al.* Antimicrobial Resistance Gene Detection Methods for
1853 Bacteria in Animal-Based Foods: A Brief Review of Highlights and
1854 Advantages. **Microorganisms**, vol. 9, n. 5, p. 923, abr. 2021.
- 1855
- 1856 GARCIA-FIERRO, R. *et al.* Comparative phylogenomics of ESBL-, AmpC- and
1857 carbapenemase-producing *K. pneumoniae* originating from companion animals and
1858 humans. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 77, n. 5, p. 1263–1271, mai.
1859 2022.
- 1860
- 1861 GAYNES, R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of
1862 Clinical Use. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 849–853, mai. 2017.
- 1863
- 1864 GAZAL L. E. S. *et al.* Detection of ESBL/AmpC-Producing and Fosfomycin-
1865 Resistant *E. coli* From Different Sources in Poultry Production in Southern Brazil.

- 1866 **Frontiers of Microbiology**, vol. 11, n. 11, p. 604544, jan., 2021.
1867
- 1868 GELPI, A.; GILBERTSON, A.; TUCKER, J. D. Magic bullet: Paul Ehrlich, Salvarsan
1869 and the birth of venereology. **Sexually Transmitted Infections**, vol. 91, n. 1, p. 68-9,
1870 fev. 2015.
1871
- 1872 GHAFOURIAN S. *et al.* Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification
1873 and Epidemiology. **Current Issues in Molecular Biology**, vol. 17, n. 1, p.11-22, mai.
1874 2015.
1875
- 1876 GHAI, I. A Barrier to Entry: Examining the Bacterial Outer Membrane and Antibiotic
1877 Resistance. **Applied Sciences (Switzerland)**, vol 13, n. 7, p. 4238, abr. 2023.
1878
- 1879 GOFFIN, C.; GHUYSEN, J. M. Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic
1880 Family of Orthologs and Paralogs. **Microbiology and molecular biology
1881 reviews**, vol. 62, n. 4, p. 1079-93, dez.1998.
1882 GOLDLUST, K. *et al.* The F pilus serves as a conduit for the DNA during conjugation
1883 between physically distant bacteria. **Proceedings of the National Academy of
1884 Sciences of the United States of America**, vol. 120, n. 47, p. e2310842120, nov.
1885 2023.
1886
- 1887 GONZALEZ, T. D. J. *et al.* Changes in Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -
1888 Lactamase Producing *Enterobacterales* in Dutch Veal Calves by Clonal Spread of
1889 *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. 866674, jun. 2022.
1890
- 1891 GOULD, K. Antibiotics: From prehistory to the present day. **The Journal of
1892 antimicrobial chemotherapy**, vol. 71, n. 3, p. 572-5, mar. 2016.
1893
- 1894 GRIEP, M. A. Primase. *In*: BRENNER, S.; MILLER, J. H. **Encyclopedia of Genetics**.
1895 2 Ed., California: Academic Press, 2001, p. 1542-1545.
1896
- 1897 GUALERZI, C. O.; PON, C. L. Initiation of mRNA translation in bacteria: structural and
1898 dynamic aspects. **Cellular and molecular life sciences**, v. 72, n. 22, p. 4341–4367,
1899 nov. 2015.
1900
- 1901 GUMMALLA, V. S. *et al.* The Role of Temperate Phages in Bacterial Pathogenicity.
1902 **Microorganisms**, vol. 11, n. 3, p. 541, feb. 2023.
1903
- 1904 GUPTA, A.; GUPTA, R.; SINGH, R. L. Microbes and Environment. **Principles and
1905 Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future**, p. 43–84,
1906 out. 2016.
1907
- 1908 GUPTA, G.; TAK, V.; MATHUR, P. Detection of AmpC β Lactamases in Gram negative
1909 Bacteria. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 6, n. 01, p. 001–006, jan. 2014.
1910
- 1911 HAENNI, M. *et al.* Enterobacterales high-risk clones and plasmids spreading
1912 blaESBL/AmpC and blaOXA-48 genes within and between hospitalized dogs and their
1913 environment. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, vol. 77, n. 10, p. 2754-
1914 2762, set. 2022.
1915

- 1916 HAJIAGHA, M. N.; KAFIL, H. S. Efflux pumps and microbial biofilm formation.
1917 **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and**
1918 **evolutionary genetics in infectious diseases**, vol. 112, n. 105459, ago. 2023.
- 1919
1920 HAMZA, D., *et al.* Emergence of β -lactamase- and carbapenemase-
1921 producing *Enterobacteriaceae* at integrated fish farms. **Antimicrobial Resistance**
1922 **and Infection Control**, vol. 9, n. 67, mai. 2020.
- 1923
1924 HAMZA, E; DORGHAM, S. M.; HAMZA, D. A. Carbapenemase-producing *Klebsiella*
1925 *pneumoniae* in broiler poultry farming in Egypt. **Journal of global antimicrobial**
1926 **resistance**, vol. 7, p. 8-10, jul. 2016.
- 1927
1928 HARRISON, F. *et al.* A 1,000-year-old antimicrobial remedy with antistaphylococcal
1929 activity. **mBio**, v. 6, n. 4, ago. 2015.
- 1930
1931 HE, Z. *et al.* Detection of CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamases producing *E.*
1932 *coli* isolates from colostrum and faeces of newborn dairy calves in China. **Pathogens**,
1933 v. 10, n. 9, set. 2021.
- 1934
1935 HOGAN, D.; KOLTER, R. Why are bacteria refractory to antimicrobials?. **Current**
1936 **opinion in microbiology**, vol. 5, n. 5, p. 472-7, out. 2002.
- 1937
1938 HOMEIER-BACHMANN, T. *et al.* Distribution of ESBL/AmpC-*Escherichia coli* on a
1939 Dairy Farm. **Antibiotics**, vol. 11, n. 7, p. 940, jul. 2022.
- 1940
1941 HOOPER, D. C.; JACOBY, G. A. Topoisomerase inhibitors: Fluoroquinolone
1942 mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in**
1943 **Medicine**, v. 6, n. 9, set. 2016.
- 1944
1945 HORTON, J. S.; TAYLOR, T. B. Mutation bias and adaptation in bacteria.
1946 **Microbiology**, vol. 169, n. 11, p. 001404, nov. 2023.
- 1947
1948 HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future.
1949 **Current opinion in microbiology**, vol. 51, p. 72-80, out, 2019.
- 1950
1951 IORIZZO, M.; PAVENTI, G.; DI MARTINO, C. Biosynthesis of Gamma-Aminobutyric
1952 Acid (GABA) by *Lactiplantibacillus plantarum* in Fermented Food Production. **Current**
1953 **issues in molecular biology**, vol. 46, n. 1, p. 200-220, dez. 2023.
- 1954
1955 IREDELL, J.; BROWN, J.; TAGG, K. Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*:
1956 mechanisms and clinical implications. **BMJ**, v. 352, n. h6420, fev. 2016.
- 1957
1958 ISHII, J.; FREITAS, J.; BAHRI ARIAS, M. V. Resistance of bacteria isolated from dogs
1959 and cats at the Londrina Veterinary Hospital (2008-2009). **Pesquisa Veterinária**
1960 **Brasileira**, v. 31, p. 533-537, jun. 2021.
- 1961
1962 JACOBY, G. A. AmpC B-Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 22, n. 1
1963 p. 161-82, jan. 2009.
- 1964
1965 JARLIER, V. *et al.* Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable

- 1966 resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence
1967 and susceptibility patterns. **Reviews of Infection Disease**, vol. 10, n. 4, p. 867–878,
1968 jul. 1988.
- 1969
- 1970 JIMENEZ-DIAZ, L.; CABALLERO, A.; SEGURA, A. Pathways for the Degradation of
1971 Fatty Acids in Bacteria. In: Rojo, F. **Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and**
1972 **Lipids**. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Cham, jan. 2023,
1973 p. 1-23.
- 1974
- 1975 JIN, D. J., *et al.* The dynamic nature and territory of transcriptional machinery in the
1976 bacterial chromosome. **Frontiers in microbiology**, v. 6, n. 497, mai. 2015.
- 1977
- 1978 JOHANSSON, V. *et al.* Genomic characterization of ESBL/AmpC-producing and high-
1979 risk clonal lineages of *E. coli* and *K. pneumoniae* in imported dogs with shelter and
1980 stray background. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 30, p. 183–190,
1981 set. 2022.
- 1982
- 1983 JUAN, C. *et al.* Diversity and regulation of intrinsic β -lactamases from non-fermenting
1984 and other Gram-negative opportunistic pathogens. **FEMS microbiology reviews**, vol.
1985 41, n. 6, p. 781-815, nov 2017.
- 1986
- 1987 JURTSCHUK JÚNIOR, P. Bacterial Metabolism. *In*: Baron S, editor. **Medical**
1988 **Microbiology**. 4 ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston;
1989 1996. Chapter 4. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7919/>.
1990 Acesso: 01 fev 2024.
- 1991
- 1992 KAMALA, K.; SIVAPERUMAL, P. Predominance of multi-drug resistant extended
1993 spectrum β lactamase producing bacteria from marine fishes. **Environmental**
1994 **pollution**, vol. 323, n. 121314, abr, 2023.
- 1995
- 1996 KANG, T. J.; HO, N. A.; PACK, S. P. Buffer-free production of gamma-aminobutyric
1997 acid using an engineered glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*. **Enzyme**
1998 **and microbial technology**, vol. 53, n. 3, p. 200-5, ago. 2013.
- 1999
- 2000 KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of
2001 antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of anaesthesiology, clinical**
2002 **pharmacology**, vol. 33, n. 3, p. 300-305, jul-set. 2017.
- 2003
- 2004 KASMAN, L. M.; PORTER, L. D. Bacteriophages. **StatPearls**. Treasure Island (FL):
2005 StatPearls Publishing, set, 2022.
- 2006
- 2007 KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal**
2008 **of industrial microbiology & biotechnology**, vol. 43, n. 2-3, p. 155-76, mar. 2016.
- 2009
- 2010 KHAN, J. *et al.* Challenges of antibiotic resistance biofilms and potential combating
2011 strategies: a review. **3 Biotech**, vol. 11, n. 4, p. 169, abr. 2021.
- 2012
- 2013 KOCH, R. Zur Untersuchung von pathogenen Organismen (1881). In: Robert Koch.
2014 **Klassische Texte der Wissenschaft**. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2018.
- 2015

- 2016 KONSTANTI, P. *et al.* Physiology of γ -aminobutyric acid production by *Akkermansia*
2017 *muciniphila*. **Applied and environmental microbiology**, vol. 90, n. 1, jan. 2024.
2018
- 2019 KOPOTSA, K. *et al.* Plasmid evolution in carbapenemase-producing
2020 Enterobacteriaceae: a review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol.
2021 1457, n. 1, p. 61-91, dez. 2019.
2022
- 2023 KOTRA, L. P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. Aminoglycosides: perspectives on
2024 mechanisms of action and resistance and strategies to counter
2025 resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3249–3256,
2026 dez. 2000.
2027
- 2028 KWON, J. *et al.* Antimicrobial Resistance and Virulence Factors of *Proteus mirabilis*
2029 Isolated from Dog with Chronic Otitis Externa. **Pathogens**, v. 11, n. 10, out. 2022.
2030
- 2031 LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. **Advanced**
2032 **drug delivery reviews**, vol. 57, n. 10, p. 1471-85, jul. 2005.
2033
- 2034 LAU, C. H. F. *et al.* A penicillin-binding protein that can promote advanced-generation
2035 cephalosporin resistance and genome adaptation in the opportunistic pathogen
2036 *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n.
2037 3, mar. 2020.
2038
- 2039 LAUBE, H. *et al.* Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-
2040 lactamase/ampC-producing *E. coli* at german broiler chicken fattening farms. **Applied**
2041 **and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 16, p. 4815–4820, ago. 2013.
2042
- 2043 LEE, C. R. *et al.* Global dissemination of carbapenemase-producing *K. pneumoniae*:
2044 Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. **Frontiers**
2045 **in Microbiology**, vol. 7, n. 895, jun. 2016.
2046
- 2047 LEES, P. *et al.* A history of antimicrobial drugs in animals: Evolution and
2048 revolution. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, vol. 44, n. 2, p.
2049 137-171, mar 2021.
2050
- 2051 LENTZ, S. A. M. *et al.* High Levels of Resistance to Cephalosporins Associated with
2052 the Presence of Extended-Spectrum and AmpC β -Lactamases in *E. coli* from Broilers
2053 in Southern Brazil. **Microbial Drug Resistance**, vol. 26, n. 5, p. 531-535, mai. 2020.
2054
- 2055 LERMINIAUX, N. A.; CAMERON, A. D. S. Horizontal transfer of antibiotic resistance
2056 genes in clinical environments. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 34–
2057 44, 2019.
2058
- 2059 LESKI, T. A.; TOMASZ, A. Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic
2060 susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the
2061 cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A. **Journal of bacteriology**, v. 187,
2062 n. 5, p. 1815–1824, mar. 2005.
2063
- 2064 LI, W. *et al.* Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein
2065 Tet(O). **Nature Communications**, v. 4, 2013.

- 2066 LIAKOPOULOS, A.; MEVIUS, D.; CECCARELLI, D. A review of SHV extended-
2067 spectrum β -lactamases: Neglected yet ubiquitous. **Frontiers in microbiology**, vol. 7,
2068 n. 1374, set. 2016.
- 2069
2070 LIMA, L. M. *et al.* β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry
2071 perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 208, n. 112829, dez.
2072 2020.
- 2073
2074 LIN, J. *et al.* Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia*
2075 *coli*. **Applied and environmental microbiology**, vol. 62, n. 9, p. 3094-100, set. 1996.
- 2076
2077 LIN, J. *et al.* Ribosome-Targeting Antibiotics: Modes of Action, Mechanisms of
2078 Resistance, and Implications for Drug Design. **Annual Review of Biochemistry**, vol.
2079 87, p. 451-478, jun. 2018.
- 2080
2081 LIN, J.; OVERBYE MICHEL, L.; ZHANG, Q. CmeABC functions as a multidrug efflux
2082 system in *Campylobacter jejuni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n.
2083 7, p. 2124–2131, 2002.
- 2084
2085 LIU, Y. *et al.* Antimicrobial resistance profiles and genotypes of extended-spectrum β -
2086 lactamase- and AmpC β -lactamase-producing *K. pneumoniae* isolated from dogs in
2087 Beijing, China. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, p. 219–222, 1 set.
2088 2017.
- 2089
2090 LIU, F. L.; KUAN, N. L.; YEH, K. S. Presence of the Extended-Spectrum- β -Lactamase
2091 and Plasmid-Mediated AmpC-Encoding Genes in *Escherichia coli* from Companion
2092 Animals-A Study from a University-Based Veterinary Hospital in Taipei,
2093 Taiwan. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1536, dez. 2021.
- 2094
2095 LIVERMORE, D M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical**
2096 **microbiology reviews**, vol. 8, n. 4, p. 557-84, out. 1995.
- 2097
2098 LOBANOVSKA, M.; PILLA, g. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance:
2099 Lessons for the Future?. **The Yale journal of biology and medicine**, vol. 90, n. 1, p.
2100 135-145, mar. 2017.
- 2101
2102 LU, W. P. *et al.* Kinetics of β -lactam interactions with penicillin-susceptible and -
2103 resistant penicillin-binding protein 2x proteins from *Streptococcus pneumoniae*.
2104 Involvement of acylation and deacylation β -lactam resistance. **Journal of Biological**
2105 **Chemistry**, v. 276, n. 34, p. 31494–31501, 24 ago. 2001.
- 2106
2107 MAINARDI, R. M. *et al.* Resistance profile and virulence characterization of
2108 *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal farm animals. **Semina: Ciências**
2109 **Agrárias**, v. 42, n. 2, p. 735-746, fev. 2021.
- 2110
2111 MAMMERI, H. *et al.* Resistance to Cefepime and Cefpirome Due to a 4-Amino-Acid
2112 Deletion in the Chromosome-Encoded AmpC β -Lactamase of a *Serratia marcescens*
2113 Clinical Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 716–720,
2114 mar. 2004.
- 2115

- 2116 MARTINEZ, J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. **Drug**
2117 **discovery today. Technologies**, vol. 11, p. 33-9, mar. 2014.
2118
- 2119 MATOS, A. *et al.* ESBL-Positive *Enterobacteriaceae* from Dogs of Santiago and Boa
2120 Vista Islands, Cape Verde: A Public Health Concern. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, 1 mar.
2121 2023.
2122
- 2123 MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and
2124 resistance. **Clinical microbiology reviews**, vol. 12, n. 1, p. 147-79, jan. 1999.
2125
- 2126 MCMURRY, L.; PETRUCCI, R. E.; LEVY, S. B. Active efflux of tetracycline encoded
2127 by four genetically different tetracycline resistance determinants in *E. coli*.
2128 **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**
2129 **America**, vol. 77, n. 7, p. 3974-7, jul. 1980.
2130
- 2131 MEINI, S. *et al.* AmpC β -lactamase-producing *Enterobacteriales*: what a clinician
2132 should know. **Infection**, vol. 47, n. 3, p. 363-375, jun. 2019.
2133 MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future
2134 perspectives. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, vol. 3, n. 1, p. 15-21,
2135 fev. 2016.
2136
- 2137 MELL, J. C.; REDFIELD, R. J. Natural competence and the evolution of DNA uptake
2138 specificity. **Journal of bacteriology**, vol. 196, n. 8, p. 1471-83, abr. 2014.
2139
- 2140 MELO, L. C. *et al.* Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-producing
2141 *Enterobacteriaceae* in healthy and diseased companion animals in Brazil. **Veterinary**
2142 **Microbiology**, v. 221, p. 59–66, jul. 2018.
2143
- 2144 MENCK-COSTA, M. F. *et al.* High-Frequency Detection of *fosA3* and *blaCTX-M-55*
2145 Genes in *E. coli* From Longitudinal Monitoring in Broiler Chicken Farms. **Frontiers in**
2146 **Microbiology**, v. 13, n. 846116, mai. 2022.
2147
- 2148 MENEZES, M. P. DE *et al.* Evaluation of the Resistance Profile of Bacteria Obtained
2149 from Infected Sites of Dogs in a Veterinary Teaching Hospital in Brazil: A Retrospective
2150 Study. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 42, n. 100489, mar. 2021.
2151
- 2152 MESSELE, Y. E. *et al.* Phenotypic and Genotypic Analysis of Antimicrobial Resistance,
2153 in *Escherichia coli* Recovered from Feedlot Beef Cattle in Australia. **Animals**, vol. 12,
2154 n. 17, p. 2256, ago. 2022.
2155
- 2156 MIHELIC, M. *et al.* The mechanism behind the selection of two different cleavage sites
2157 in NAG-NAM polymers. **IUCrJ**, vol. 4, Pt, 2, p. 185-198, Fev. 2017.
2158
- 2159 MILLER, S. I.; SALAMA, N. R. The Gram-negative bacterial periplasm: Size matters.
2160 **PLoS Biology**, vol. 16, n. 1, e2004935, jan. 2018.
2161
- 2162 MINATO, Y. *et al.* Mutual potentiation drives synergy between trimethoprim and
2163 sulfamethoxazole. **Nature Communications**, v. 9, n. 1003, mar. 2018.
2164
- 2165 MONTSO, K. P. *et al.* Antimicrobial Resistance Factors of Extended-Spectrum Beta-

- 2166 Lactamases Producing *E. coli* and *K. pneumoniae* Isolated from Cattle Farms and Raw
2167 Beef in North-West Province, South Africa. **BioMed Research International**, v. 2019,
2168 n. 4318306, nov. 2019.
- 2169
2170 MOORE-MACHACEK, A. *et al.* Efflux, Signaling and Warfare in a Polymicrobial
2171 World. **Antibiotics**, vol. 12, n. 4, p. 731, abr. 2023.
- 2172
2173 MOTA, L. M. *et al.* Rational use of antimicrobials. **Medicina**, vol. 42, n. 2, p.164-72,
2174 jun. 2010.
- 2175
2176 MOUBARECK, C. A. Polymyxins and Bacterial Membranes: A Review of Antibacterial
2177 Activity and Mechanisms of Resistance. **Membranes**, vol. 10, n. 8, p. 181, ago. 2020.
- 2178
2179 MOREIRA, M. A. S.; SOUZA, E. C.; MORAES, C. A. Multidrug efflux systems in Gram-
2180 negative bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 19-28, jun. 2004.
- 2181
2182 MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology**
2183 **Spectrum**, v. 4, n. 2, 25 mar. 2016.
- 2184
2185 MUSCHIOL, S. *et al.* Uptake of extracellular DNA: Competence induced pili in natural
2186 transformation of *Streptococcus pneumoniae*. **BioEssays**, v. 37, n. 4, p. 426–435, abr.
2187 2015.
- 2188
2189 NAGAKUBO, S. *et al.* The putative response regulator BaeR stimulates multidrug
2190 resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. **Journal**
2191 **of bacteriology**, v. 184, n. 15, p. 4161–4167, ago. 2002.
- 2192
2193 NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US). Committee to Study the Human Health
2194 Effects of Subtherapeutic Antibiotic Use in Animal Feeds. **The Effects on Human**
2195 **Health of Subtherapeutic Use of Antimicrobials in Animal Feeds**. National
2196 Academies Press, US, 1980.
- 2197
2198 NI, R. T. *et al.* The role of RND-type efflux pumps in multidrug-resistant mutants of *K.*
2199 *pneumoniae*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, dez. 2020.
- 2200
2201 NIKAIDO, H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and
2202 active efflux in bacteria. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 12, n. 3, p.
2203 215–223, jun. 2001.
- 2204
2205 NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited.
2206 **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 593–656, dez. 2003.
- 2207 NIKAIDO H. Multidrug resistance in bacteria. **Annual review of biochemistry**, v. 78,
2208 p. 119–146, 2009.
- 2209
2210 NIKAIDO, H.; PAGÈS, J. M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug
2211 resistance of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 36, n. 2, p.
2212 340-63, mar. 2012.
- 2213
2214 NILSSON, O. *et al.* Decreased detection of ESBL- or pAmpC-producing *Escherichia*
2215 *coli* in broiler breeders imported into Sweden. **Acta veterinaria Scandinavica**, vol. 62,

- 2216 n. 1, p. 33, jun. 2020.
2217
- 2218 NOBREGA, D. B. *et al.* Molecular characterization of antimicrobial resistance in *K.*
2219 *pneumoniae* isolated from Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n.
2220 6, p. 7210–7224, jun. 2021.
2221
- 2222 OMS. Organização mundial da Saúde. **Critically Important Antimicrobials for**
2223 **Human Medicine.** 2019. Disponível em:
2224 <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528> . Acesso: 05 dez. 2023
2225 05/12/2023
2226
- 2227 OMS. Organização mundial da Saúde. No time to wait: securing the future from drug-
2228 resistant infections. **Report to the Secretary-General of the United Nations.** 2021.
2229 Disponível em: [https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-](https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/)
2230 [group/final-report/en/](https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/). Acesso: 05 mai. 2022.
2231
- 2232 OMS. Organização mundial da Saúde. **Antimicrobial resistance.** 2023. Disponível
2233 em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance.](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance)
2234 Acesso: 05 dez. 2023.
2235
- 2236 ORTIZ, D. A. *et al.* Comparative regional surveillance for multidrug resistant fecal *E.*
2237 *coli* in cattle, dogs and humans benchmarks gene pool predominance of CMY-2, CTX-
2238 M-15-like and CTX-M-9 group β -lactamases with highest carriage rate in cattle.
2239 **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, vol. 89, n.
2240 101880, out. 2022.
2241
- 2242 OTTEN, H. Domagk and the development of the sulphonamides. **The Journal of**
2243 **antimicrobial chemotherapy**, vol. 17, n. 6, p. 689-96, jun. 1986.
2244
- 2245 PACHORI, P.; GOTHALWAL, R.; GANDHI, P. Emergence of antibiotic
2246 resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. **Genes &**
2247 **diseases**, vol. 6, n. 2, p. 109–119, abr. 2019.
2248
- 2249 PAHO. Pan American Health Organization. **Antimicrobial Resistance, Fueled by the**
2250 **COVID-19 Pandemic.** Policy Brief November 2021. Disponível em:
2251 <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55864>. Acesso: 09 nov. 2023.
2252
- 2253 PAGES, J. M. *et al.* Efflux pump, the masked side of beta-lactam resistance in *K.*
2254 *pneumoniae* clinical isolates. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 12 mar. 2009.
2255
- 2256 PAGES, J. M.; JAMES, C. E.; WINTERHALTER, M. The porin and the permeating
2257 antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram negative bacteria. **Nature reviews.**
2258 **Microbiology**, vol. 6, n. 12, p. 893-903, dez. 2008.
2259
- 2260 PAITAN, Y. Current trends in antimicrobial resistance of *E. coli*. **Current topics in**
2261 **microbiology and immunology**, vol. 416, p. 181-211, 2018.
2262
- 2263 PÄIVÄRINTA, M. *et al.* Whole genome sequence analysis of antimicrobial resistance
2264 genes, multilocus sequence types and plasmid sequences in ESBL/AmpC *Escherichia*
2265 *coli* isolated from broiler caecum and meat. **International journal of food**

- 2266 **microbiology**, vol. 315, n. 108361, fev. 2020.
2267
- 2268 PALMEIRA, J. D. *et al.* Emergence and spread of cephalosporinases in wildlife: A
2269 review. **Animals**, vol. 11, n. 6, p. 1765, jun. 2021.
2270
- 2271 PALZKILL, T. Structural and mechanistic basis for extended-spectrum drug-resistance
2272 mutations in altering the specificity of TEM, CTX-M, and KPC β -lactamases. **Frontiers**
2273 **in Molecular Biosciences**, vol. 5 n. 16, fev. 2018.
2274
- 2275 PANCU, D. F. *et al.* Antibiotics: Conventional Therapy and Natural Compounds with
2276 Antibacterial Activity-A Pharmacotoxicological Screening. **Antibiotics**, vol. 10, n. 4,
2277 p. 401, abr. 2021.
2278
- 2279 PANDEY, N.; CASCELLA, M. Beta-Lactam Antibiotics. *In: StatPearls* [Internet].
2280 Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, jun. 2023.
2281
- 2282 PARTRIDGE, S. R. *et al.* Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial
2283 Resistance. **Clinical microbiology reviews**, vol. 31, n. 4 e00088-17, ago. 2018.
2284
- 2285 PASTERAN, F. *et al.* Triton Hodge Test: Improved Protocol for Modified Hodge Test
2286 for Enhanced Detection of NDM and Other Carbapenemase Producers. **Journal of**
2287 **Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 640–649, mar. 2016.
2288
- 2289 PATERSON, D. L. Resistance in Gram negative bacteria: *Enterobacteriaceae*.
2290 **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5, jun. 2006.
2291
- 2292 PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: A clinical
2293 update. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 18, n. 4, p. 657-86, out. 2005.
2294
- 2295 PATRICIO, T. C. C. *et al.* Production of extended-spectrum beta-lactamases
2296 in *Escherichia coli* isolated from poultry in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian journal of**
2297 **veterinary medicine**, vol. 44, n. e001722, dez. 2022.
2298
- 2299 PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing
2300 *Enterobacteriaceae*: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options.
2301 **Drugs**, vol. 79, n. 14, p. 1529-1541, set. 2019.
2302
- 2303 PERERA, V. *et al.* Performance of Phenotypic Tests to Detect β -Lactamases in a
2304 Population of β -Lactamase Coproducing *Enterobacteriaceae* Isolates. **Journal of**
2305 **laboratory physicians**, vol. 15, n. 1, p. 117-125, jan. 2023.
2306
- 2307 PETER-GETZLAFF, S. *et al.* Detection of AmpC beta-lactamase in *E. coli*: Comparison
2308 of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. **Journal of Clinical**
2309 **Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 2924–2932, ago. 2011.
2310
- 2311 PETERHANS, S. *et al.* First report of a bla_{NDM-5}-harbouring *Escherichia coli* ST167
2312 isolated from a wound infection in a dog in Switzerland. **Journal of global**
2313 **antimicrobial resistance**, vol. 15, p. 226-227, out, 2018.
2314
- 2315 PETERSON, E.; KAUR, P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships

- 2316 between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and
2317 clinical pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2928., nov. 2018.
2318
- 2319 PICCOLO, F. L. *et al.* Detection of multidrug resistance and extended-
2320 spectrum/plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in *Enterobacteriaceae*
2321 isolates from diseased cats in Italy. **Journal of feline medicine and surgery**, vol. 22,
2322 n. 7, p. 613-622, jul. 2020.
2323
- 2324 PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance
2325 efflux pumps in bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 19, n. 2, p. 382–402,
2326 abr. 2006.
2327
- 2328 PINTO, R. M. *et al.* Innovative Strategies Toward the Disassembly of the EPS Matrix
2329 in Bacterial Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, vol. 11, n. 952. mai. 2020.
2330
- 2331 PLASSARD, V. *et al.* Surveillance of Extended-Spectrum β -Lactamase-,
2332 Cephalosporinase- and Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria in Raw
2333 Milk Filters and Healthy Dairy Cattle in Three Farms in *Île-de-France*,
2334 France. **Frontiers in veterinary science**, vol. 8, n. 633598, fev. 2021.
2335
- 2336 POIREL, L. *et al.* Emergence in *K. pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV β -
2337 lactamase that compromises the efficacy of imipenem. **Antimicrobial Agents and**
2338 **Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 755–758, fev. 2003.
2339
- 2340 POLSFUSS, S. *et al.* Practical approach for reliable detection of AmpC beta-
2341 lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n.
2342 8, p. 2798–2803, ago. 2011.
2343
- 2344 POOLE, K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas*
2345 *aeruginosa* and related organisms. **Journal of molecular microbiology and**
2346 **biotechnology**, vol. 3, n, 2 p. 255-64, abr. 2001.
2347
- 2348 POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial**
2349 **Chemotherapy**, vol. 56, n. 1, jul. 2005.
2350
- 2351 PRESCOTT, J. F. History and Current Use of Antimicrobial Drugs in Veterinary
2352 Medicine. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 6, dez. 2017.
2353
- 2354 PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: A global
2355 multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, vol. 109, n. 7, p. 309-18,
2356 out. 2015.
2357
- 2358 PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M. Antibacterial drug discovery: is it all downhill from
2359 here? The increase in the levels. **Clinical microbiology and infection: the official**
2360 **publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious**
2361 **Diseases**, vol. 10 Suppl 4, p. 18-22, nov. 2004.
2362
- 2363 QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. **Clinical**
2364 **microbiology reviews**, vol. 20, n. 3, p. 440-58, jul. 2007.
2365

- 2366 RAFIQ, Z.; SAM, N.; VAIDYANATHAN, R. Whole genome sequence of *Klebsiella*
2367 *pneumoniae* U25, a hypermucoviscous, multidrug resistant, biofilm producing isolate
2368 from India. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 2, p. 144–146, fev. 2016.
2369
- 2370 RAJAPAKSHA, P. *et al.* Insight into the acrab-tolc complex assembly process learned
2371 from competition studies. **Antibiotics**, v. 10, n. 7, jul. 2021.
2372
- 2373 RATHER, M. A.; GUPTA, K.; MANDAL, M. Microbial biofilm: formation, architecture,
2374 antibiotic resistance, and control strategies. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol.
2375 52, n. 4, p. 1701-1718, dez. 2021.
2376
- 2377 RAWAT, D.; NAIR, D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram negative bacteria.
2378 **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 263, set. 2010.
2379
- 2380 REN, Y. *et al.* Emergent heterogeneous microenvironments in biofilms: Substratum
2381 surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing. **FEMS Microbiology**
2382 **Reviews**, vol. 42, n. 3, p. 259-272, mai. 2018.
2383
- 2384 RENTSCHLER, S.; KAISER, L.; DEIGNER, H.-P. Emerging Options for the Diagnosis
2385 of Bacterial Infections and the Characterization of Antimicrobial
2386 Resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 456, jan.
2387 2021.
2388
- 2389 REYES, J. A. *et al.* Mobile genetic elements associated with carbapenemase genes in
2390 South American *Enterobacterales*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, vol. 24,
2391 n. 3, p. 231-238, mai. 2020.
2392
- 2393 REYGAERT, W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria.
2394 **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018.
2395
- 2396 REYNOLDS, M. E. *et al.* Occurrence and characterization of *Escherichia coli* ST410
2397 co-harboring blaNDM-5, blaCMY-42 and blaTEM-190 in a dog from the UK. **The**
2398 **Journal of antimicrobial chemotherapy**, vol. 74, n. 5, p. 1207-1211, mai. 2019.
2399
- 2400 RICHEZ, P.; BURCH. D. G. S. Colistin in animals: a high risk for resistance selection
2401 in Europe?. **The Veterinary record**, vol. 178, n. 4, p. 101-2, jan. 2016.
2402
- 2403 RIZVI, M. *et al.* Reliability of carbapenem inactivation method (CIM) and modified
2404 carbapenem inactivation method (mCIM) for detection of OXA-48-like and NDM-1.
2405 **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 451–456, 1 out. 2021.
2406
- 2407 ROHDE, A., *et al.* Overview of validated alternative methods for the detection of
2408 foodborne bacterial pathogens. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p.
2409 113–118, fev. 2017.
2410
- 2411 ROSSINI, N. O.; DIAS, M. V. B. Mutations and insights into the molecular mechanisms
2412 of resistance of Mycobacterium tuberculosis to first-line drugs. **Genetics and**
2413 **Molecular Biology**, vol. 46, 1 Suppl 2, e20220261, jan. 2023.
2414
- 2415 ROY, R. *et al.* Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents

- 2416 and their mechanisms of action. **Virulence**, vol. 9, n. 1, p. 522-554, jan. 2018.
- 2417
- 2418 SAHA, M.; SARKAR, A. Review on multiple facets of drug resistance: A rising
- 2419 challenge in the 21st century. **Journal of Xenobiotics**, v. 11, n. 4, p. 197–214, dez.
- 2420 2021.
- 2421
- 2422 SALGADO-CAXITO, M. *et al.* Risk factors associated with faecal carriage of extended-
- 2423 spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* among dogs in Southeast
- 2424 Brazil. **Preventive veterinary medicine**, v. 190, n. 105316, mai. 2021.
- 2425
- 2426 SANTOS, J. P. DOS *et al.* Antimicrobial resistance profile of extended-spectrum beta-
- 2427 lactamases, adenosine-monophosphate-cyclic, and carbapenemase-producing Gram
- 2428 negative bacteria isolated from domestic animals. **Veterinary World**, v. 14, n. 12, p.
- 2429 3099–3104, dez. 2021.
- 2430
- 2431 SANTOS-LOPEZ, A. *et al.* The roles of history, chance, and natural selection in the
- 2432 evolution of antibiotic resistance. **eLife**, v. 10, ago. 2021.
- 2433
- 2434 SARTORI, L. *et al.* Draft genome sequences of two fluoroquinolone-resistant CTX-M-
- 2435 15-producing *Escherichia coli* ST90 (ST23 complex) isolated from a calf and a dairy
- 2436 cow in South America. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 11, 145–147,
- 2437 dez. 2017.
- 2438
- 2439 SARTORI, L. *et al.* Multidrug-resistant CTX-M-15-positive *K. pneumoniae* ST307
- 2440 causing urinary tract infection in a dog in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial**
- 2441 **Resistance**, vol. 19, p. 96-97, dez. 2019.
- 2442
- 2443 SARTORI, L. *et al.* Genomic features of a polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae*
- 2444 ST491 isolate co-harboring bla_{CTX-M-8} and qnrE1 genes from a hospitalised cat in São
- 2445 Paulo, Brazil. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 21, p. 186–187, jun.
- 2446 2020.
- 2447
- 2448 SAVAGE, P. B. Multidrug-resistant bacteria: overcoming antibiotic permeability
- 2449 barriers of gram-negative bacteria. **Annals of medicine**, vol. 33, n. 3, p. 167-71, abr.
- 2450 2001.
- 2451
- 2452 SAUVAGE, E. *et al.* The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan
- 2453 biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 32, n. 2, p. 234-58, mar. 2008.
- 2454
- 2455 SAUVAGE, E.; TERRAK, M. Glycosyltransferases and transpeptidases/penicillin-
- 2456 binding proteins: Valuable targets for new antibacterials. **Antibiotics**, vol. 5, n. 1, p.
- 2457 12, fev. 2016.
- 2458
- 2459 SELLERA, F. P. *et al.* Identification of KPC-2-producing *Escherichia coli* in a
- 2460 companion animal: a new challenge for veterinary clinicians. **The Journal of**
- 2461 **antimicrobial chemotherapy**, vol. 73, n. 8, p. 2259-2261, ago. 2018.
- 2462
- 2463 SELLERA, F. P. *et al.* Genomic analysis of multidrug-resistant CTX-M-15-positive
- 2464 *Klebsiella pneumoniae* belonging to the highly successful ST15 clone isolated from a
- 2465 dog with chronic otitis. **Journal of global antimicrobial resistance**, vol. 22, p. 659-

- 2466 661, set. 2020.
2467
- 2468 SELLETA, F. P. *et al.* Detection of IncN-pST15 one-health plasmid harbouring bla_{KPC-2}
2469 in a hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated from an infected dog,
2470 Brazil. **Transboundary and emerging diseases**, vol. 68, n. 6, p. 3083-3088, nov.
2471 2021.
2472
- 2473 SFACIOTTE, R. A. P. *et al.* Identification and Characterization of Multidrug-Resistant
2474 Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria from Healthy and Diseased
2475 Dogs and Cats Admitted to a Veterinary Hospital in Brazil. **Microbial Drug**
2476 **Resistance**, v. 27, n. 6, p. 855–864, jun. 2021.
2477
- 2478 SHAIKH, S. *et al.* Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases:
2479 Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n.
2480 1, p. 90–101, jan. 2015.
2481
- 2482 SHANMUGAKANI, R. K. *et al.* Current state of the art in rapid diagnostics for
2483 antimicrobial resistance. **Lab on a chip**, v. 20, n. 15, p. 2607–2625, jul. 2020.
2484
- 2485 SHARMA, A.; GUPTA, V. K.; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial
2486 pathogens: From bench to bedside. **The Indian journal of medical research**, vol.
2487 149, n. 2, p. 129–145, fev. 2019.
2488
- 2489 SHARMA, D.; MISBA, L.; KHAN, A. U. Antibiotics versus biofilm: An emerging
2490 battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance and Infection**
2491 **Control**, vol. 8, n. 76, mai. 2019.
2492
- 2493 SHRESTHA, L. *et al.* Recent Strategies to Combat Biofilms Using Antimicrobial Agents
2494 and Therapeutic Approaches. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, vol. 11, n. 3, p. 292,
2495 fev. 2022.
2496
- 2497 SHIN, S. R. *et al.* Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing and
2498 AmpC β -Lactamase-Producing *Enterobacteriales* Isolated from Companion Animals in
2499 Korea. **Antibiotics**, vol. 10, n. 3, p. 249, mar. 2021.
2500
- 2501 SHINTANI, M.; SANCHEZ, Z. K.; KIMBARA, K. Genomics of microbial plasmids:
2502 Classification and identification based on replication and transfer systems and host
2503 taxonomy. **Frontiers in Microbiology**, vol. 6, n. 242, Mar. 2015.
2504
- 2505 SHRYOCK, T. R.; RICHWINE, A. The interface between veterinary and human
2506 antibiotic use. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1213, n. 1, p. 92–
2507 105, 2010.
2508
- 2509 SIERRA, T. A. O. *et al.* Occurrence of extended-spectrum β -lactamase-producing
2510 *Enterobacteriaceae* in raw milk from cows with subclinical mastitis in northeast
2511 Brazil. **Brazilian journal of microbiology**, vol. 54, n. 2, p. 1303-1307, jun. 2023.
2512
- 2513 SILHAVY, T. J., KAHNE, D., & WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring**
2514 **Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 5, a000414, mai. 2010.
2515

- 2516 SILVA, B. A. *et al.* Characterization of ESBL/AmpC-producing extraintestinal *E. coli*
2517 (ExPEC) in dogs treated at a veterinary hospital in Brazil. **Research in veterinary**
2518 **science**, vol. 166, n.105106, jan. 2024.
- 2519
2520 SILVA, C. P. *et al.* CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* ST273 associated with
2521 nasal infection in a domestic cat. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 28,
2522 p. 203–205, mar. 2022.
- 2523
2524 SIVARAMAN, G. K. *et al.* Molecular assessment of antimicrobial resistance and
2525 virulence in multi drug resistant ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella*
2526 *pneumoniae* from food fishes, Assam, India. **Microbial pathogenesis**, vol. 149, n.
2527 104581, dez. 2020.
- 2528
2529 SPAANS, S. K. *et al.* NADPH-generating systems in bacteria and archaea. **Frontiers**
2530 **in microbiology**, vol. 6, n. 742, jul. 2015.
- 2531
2532 STEIN, L. Y.; MARTIN, G. K. The nitrogen cycle. **Current biology**, vol. 26, n. 3, R94-
2533 8, fev. 2016.
- 2534
2535 STRAUME, D. *et al.* Class A PBPs have a distinct and unique role in the construction
2536 of the pneumococcal cell wall. **Proceedings of the National Academy of Sciences**
2537 **of the United States of America**, vol. 117, n. 11, p. 6129-6138, mar, 2020.
- 2538
2539 STREBHARDT, K.; ULLRICH, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of
2540 progress. **Nature reviews. Cancer**, vol. 8, n. 6, p. 473–480, jun. 2008.
- 2541
2542 SUN, F. *et al.* Protein cysteine phosphorylation of SarA/MgrA family transcriptional
2543 regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance. **Proceedings of the**
2544 **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 38, p.
2545 15461–15466, set. 2012.
- 2546
2547 TAMMA, P. D. *et al.* A Primer on AmpC β -Lactamases: Necessary Knowledge for an
2548 Increasingly Multidrug-resistant World. **Clinical infectious diseases: an official**
2549 **publication of the Infectious Diseases Society of America**, vol. 69, n. 8, p. 1446-
2550 1455, set. 2019.
- 2551
2552 TAN, H. S. *et al.* Characterisation of ESBL/AmpC-Producing *Enterobacteriaceae*
2553 isolated from poultry farms in Peninsular Malaysia. **Letters in applied microbiology**.
2554 vol. 76, n. 1, p. ovac044, jan. 2023.
- 2555
2556 TANG, K. L. *et al.* Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its
2557 associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a
2558 systematic review and meta-analysis. **The Lancet Planetary Health**, v. 1, n. 8, p.
2559 e316–e327, nov. 2017.
- 2560
2561 TAO, S. *et al.* The Spread of Antibiotic Resistance Genes In Vivo Model. **Canadian**
2562 **Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, vol. 2022, n. 3348695
2563 2022.
- 2564
2565 TELLO, M. *et al.* Within-farm dynamics of ESBL-producing *Escherichia coli* in dairy

- 2566 cattle: Resistance profiles and molecular characterization by long-read whole-genome
2567 sequencing. **Frontiers in microbiology**, vol. 13, n. 936843, jul. 2022.
2568
- 2569 TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **American**
2570 **Journal of Medicine**, v. 119, n. 6 SUPPL. jun. 2006.
2571
- 2572 THOMSON, K. *et al.* Characterisation of and risk factors for extended-spectrum β -
2573 lactamase producing *Enterobacterales* (ESBL-E) in an equine hospital with a special
2574 reference to an outbreak caused by *K. pneumoniae* ST307:CTX-M-1. **Acta Veterinaria**
2575 **Scandinavica**, v. 64, n. 1, dez. 2022.
2576
- 2577 TOOKE, C. L. *et al.* β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st
2578 Century. **Journal of molecular biology**, vol. 431, n. 18, p. 3472–3500, ago. 2019.
2579
- 2580 TORRES-BARCELÓ, C. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-
2581 resistant bacteria. **Emerging Microbes and Infections**, vol. 7, n. 1, p. 168, dez.
2582 2018.
2583
- 2584 TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R; CASE, C.L. **Microbiologia**. 12ed. Porto Alegre:
2585 Artmed, 2017, 935 p.
2586
- 2587 TOUSSAINT, K. A.; GALLAGHER, J. C. β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations:
2588 from then to now. **The Annals of pharmacotherapy**, vol. 49, n. 1, p. 86-98, jan. 2015.
2589
- 2590 TSAI, A. *et al.* The impact of aminoglycosides on the dynamics of translation
2591 elongation. **Cell reports**, vol. 3, n. 2, p. 497–508, fev. 2013.
2592
- 2593 TSAI, Y. M. *et al.* Combination of modified carbapenem inactivation method (mCIM)
2594 and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase-producing
2595 *Enterobacteriaceae*. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, dez. 2020.
2596
- 2597 TU, Q. *et al.* *Acinetobacter Baumannii* Phages: Past, Present and Future. **Viruses**, vol.
2598 15, n. 3, p. 673, mar. 2023.
2599
- 2600 TZOUVELEKIS, L. S., *et al.* Rare case of failure by an automated system to detect
2601 extended-spectrum beta-lactamase in a cephalosporin-resistant *Klebsiella*
2602 *pneumoniae* isolate. **Journal of clinical microbiology**, vol. 37, n. 7, p. 2388, jun.
2603 1999.
2604
- 2605 TZOUVELEKIS, L. S.; BONOMO, R. A. SHV-type beta-lactamases. **Current**
2606 **pharmaceutical design**, vol. 5, n. 11, p. 847–864, nov. 1999.
2607
- 2608 VAN DIJK, B. *et al.* Slightly beneficial genes are retained by bacteria evolving DNA
2609 uptake despite sel1sh elements. **eLife**, v. 9, n. e56801, p. 1–36, mai. 2020.
2610
- 2611 VAN GROESEN, E. *et al.* Vancomyxins: Vancomycin-Polymyxin Nonapeptide
2612 Conjugates That Retain Anti-Gram-Positive Activity with Enhanced Potency against
2613 Gram-Negative Strains. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 2746–2754, set. 2021.
2614
- 2615 VASALA, A.; HYTÖNEN, V. P.; LAITINEN, O. H. Modern Tools for Rapid Diagnostics

- 2616 of Antimicrobial Resistance. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10,
2617 n. 308, jul. 2020.
- 2618
- 2619 VÁSQUEZ-PONCE, F. *et al.* Detecting KPC-2 and NDM-1 Coexpression in *Klebsiella*
2620 *pneumoniae* Complex from Human and Animal Hosts in South America. **Microbiology**
2621 **spectrum**, vol. 10, n. 5, p. e0115922, out. 2022.
- 2622
- 2623 VÁZQUEZ-LASLOP, N.; MANKIN, A. S. How Macrolide Antibiotics Work. **Trends in**
2624 **biochemical sciences**, vol. 43, n. 9, p. 668-684, set. 2018.
- 2625
- 2626 VELASOVA, M. *et al.* Detection of extended-spectrum β -lactam, AmpC and
2627 carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae* in beef cattle in Great Britain in
2628 2015. **Journal of applied microbiology**, vol. 126, n. 4, p. 1081-1095, abr. 2019.
- 2629
- 2630 VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T: a**
2631 **peer-reviewed journal for formulary management**, vol. 40, n. 4, p. 277-83, abr.
2632 2015.
- 2633
- 2634 VERKOLA, M. *et al.* Low prevalence of zoonotic multidrug-resistant bacteria in
2635 veterinarians in a country with prudent use of antimicrobials in animals. **Zoonoses and**
2636 **public health**, vol. 66, n. 6, p. 667–678, set. 2019.
- 2637
- 2638 VERMA, V. *et al.* Hydrolytic mechanism of OXA-58 enzyme, a carbapenem-
2639 hydrolyzing class D β -lactamase from *Acinetobacter baumannii*. **The Journal of**
2640 **biological chemistry**, v. 286, n. 43, p. 37292–37303, out. 2011.
- 2641
- 2642 VIROLLE, C. *et al.* Plasmid transfer by conjugation in Gram negative bacteria: From
2643 the cellular to the community level. **Genes**, vol. 11, n. 11, p. 1239, nov. 2020.
- 2644
- 2645 VRIES, J. DE; WACKERNAGEL, W. Integration of foreign DNA during natural
2646 transformation of *Acinetobacter* spp. by homology-facilitated illegitimate
2647 recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United**
2648 **States of America**, vol. 99, n. 4, p. 2094-9, fev. 2002.
- 2649
- 2650 WACHINO, J. I. *et al.* Horizontal transfer of bla_{CMY}-bearing plasmids among clinical
2651 *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates and emergence of cefepime-hydrolyzing CMY-19.
2652 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 534–541, fev. 2006.
- 2653
- 2654 WAKSMAN, S. A. What is an antibiotic or an antibiotic substance? **Mycologia**, vol. 39,
2655 n. 5, p. 565–569, set. 1947.
- 2656
- 2657 WALLINGA, D.; BURCH, D. G. S. Does adding routine antibiotics to animal feed pose
2658 a serious risk to human health? **BMJ (Online)**, v. 347, n. 7917, jul. 2013.
- 2659
- 2660 WANG, G. *et al.* The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *K.*
2661 *pneumoniae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**.
2662 vol. 17, n. 17, p. 6278, ago. 2020.
- 2663
- 2664 WANG, J., *et al.* Whole-genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain LCT-
2665 SA112. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 15, p. 4124, ago. 2012.

- 2666 WATSON, A. D. J. Chloramphenicol plasma levels in the dog: a comparison of oral,
2667 subcutaneous and intramuscular administration. **The Journal of small animal**
2668 **practice**, vol. 13, n. 3, p. 147-51, mar. 1972.
- 2669
2670 WEISBLUM, B. Erythromycin resistance by ribosome modification. **Antimicrobial**
2671 **agents and chemotherapy**, vol. 39, n. 3, p. 577-85, mar. 1995.
- 2672
2673 WILSON, D. N. *et al.* Target protection as a key antibiotic resistance mechanism.
2674 **Nature Reviews Microbiology**, vol. 18, p. 637- 648, jun. 2020.
- 2675
2676 WINTERSDORFF, C. J. H. V. *et al.* Dissemination of antimicrobial resistance in
2677 microbial ecosystems through horizontal gene transfer. **Frontiers in Microbiology**.
2678 vol. 7, n. 173, fev. 2016.
- 2679
2680 WITTE, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **Science (New York,**
2681 **N.Y.)**, vol. 279, n. 996-7, fev. 1998.
- 2682
2683 WIUFF, C. *et al.* Phenotypic tolerance: Antibiotic enrichment of noninherited resistance
2684 in bacterial populations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p.
2685 1483–1494, abr. 2005.
- 2686
2687 WOODFORD, N.; ELLINGTON, M. J. The emergence of antibiotic resistance by
2688 mutation. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 13, n. 1, p. 5-18, jan. 2006.
- 2689
2690 YAMIN, D. *et al.* Current and Future Technologies for the Detection of Antibiotic-
2691 Resistant Bacteria. **Diagnostics**, vol. 13, n. 20, p. 3246, out. 2023.
- 2692
2693 YAN, Y. H.; LI, G.; LI, G. B. Principles and current strategies targeting metallo- β -
2694 lactamase mediated antibacterial resistance. **Medicinal Research Reviews**, vol. 40,
2695 n. 5, p. 1558-1592, set. 2020.
- 2696
2697 YANG, F. *et al.* Tracking high-risk β -lactamase gene (*bla* gene) transfers in two
2698 Chinese intensive dairy farms. **Environmental pollution**, vol. 274, n. 116593, abr.
2699 2021.
- 2700
2701 YIN, W. *et al.* Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments.
2702 **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, jul. 2019.
- 2703
2704 YOUSFI, M. *et al.* Emergence of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolated
2705 from Companion Animals in Algeria. **Microbial drug resistance**, vol. 22, n. 4, p. 342-
2706 6, jun. 2016.
- 2707
2708 ZENG, X.; LIN, J. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram negative
2709 bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 128, mai. 2013.
- 2710
2711 ZHANEL, G. G. *et al.* Ceftolozane/tazobactam: A novel cephalosporin/ β -lactamase
2712 inhibitor combination with activity against multidrug-resistant Gram-negative bacilli.
2713 **Drugs**, vol. 74, n. 1, p. 31-51, jan. 2014.

2714 **4 HIPOTESE**

2715 Bactérias patogênicas multirresistentes ou extensivamente resistentes a
2716 antibacterianos que possuem enzimas beta-lactamases codificadas por genes
2717 adquiridos estão presentes em pacientes com infecções ativas em hospitais
2718 veterinários e em animais de produção.

2719 5 OBJETIVOS

2720 5.1 OBJETIVO GERAL

2721 Detectar a produção de beta lactamases e a presença de genes codificadores
2722 para essas enzimas em isolados da família *Enterobacteriaceae* de amostras de
2723 animais de companhia e produção.

2724 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2725 • Selecionar isolados considerados multirresistentes em laudos e prontuários
2726 veterinários de amostras biológicas provenientes de animais de companhia
2727 e produção processadas no Laboratório de Bacteriologia Veterinária do
2728 Hospital Veterinário da UEL;
- 2729 • Realizar o teste de sensibilidade aos antibacterianos em isolados de
2730 *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. e caracterizar as cepas como
2731 multirresistentes, extensivamente resistentes e pan-resistentes;
- 2732 • Realizar testes fenotípicos para produção de beta lactamases nos isolados
2733 bacterianos;
- 2734 • Detectar de genes de resistência codificadores de beta lactamases
2735 presentes nos isolados por métodos moleculares (PCR e mPCR);
- 2736 • Comparar o perfil de resistência aos antibacterianos entre testes fenotípicos
2737 e genotípicos;
- 2738 • Realizar sequenciamento genômico dos produtos amplificados pelas
2739 técnicas de PCR/mPCR de gene codificadores de beta lactamases e
2740 depositar as sequências geradas em bancos públicos de dados;
- 2741 • Averiguar diferença estatística em relação a resistência bacteriana a
2742 antibacterianos da mesma classe e entre classes.

2743 **6 ARTIGO**

2744 CHARACTERIZATION OF ESBL, AMPC, AND CARBAPENEMASE-PRODUCING
2745 *ENTEROBACTERIACEAE* ISOLATED FROM COMPANION AND PRODUCTION
2746 ANIMALS IN BRAZIL

2747 6.1 RESUMO

2748 A crise da resistência bacteriana é um desafio emergente de saúde pública,
2749 impulsionado pelo uso excessivo de antibacterianos em vários ambientes médicos e
2750 agrícolas. Este estudo teve como objetivo detectar a produção de beta-lactamases de
2751 espectro estendido (ESBLs), Ampicilinases (AmpC) e carbapenemases, e a presença
2752 de genes que codificam essas enzimas em *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus*
2753 spp., principais contribuintes para infecções e isolados de resistência de animais. De
2754 2016 a 2021, 130 isolados multirresistentes (MDR) ou extensivamente resistentes
2755 (XDR) foram recuperados de secreções, excreções e órgãos de animais de
2756 companhia e de produção com infecção ativa. Foram realizados testes de
2757 sensibilidade antibacteriana juntamente com a detecção fenotípica e genotípica de
2758 enzimas de resistência. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo no Brasil que
2759 estima XDR *Enterobacteriaceae* isoladas em animais de companhia e de produção,
2760 atingindo 13,8% de nossas amostras. Foram encontradas diferenças estatísticas
2761 ($P \leq 0,05$) de bactérias resistentes entre diferentes classes e dentro da mesma classe
2762 de antibacterianos. Também foi estabelecida a probabilidade estatística entre
2763 detecção por detecção genotípica para ESBL (OR = 3,1) e testes fenotípicos para
2764 AmpC (OR = 2,3). Cerca de 32,3%, 17,6% e 16,8% das amostras foram positivas nos
2765 testes fenotípicos para ESBL, AmpC e um teste de carbapenemase, respectivamente.
2766 A análise genética revelou a presença do grupo de genes *bla*CTX-M (60,0%),
2767 *bla*AmpC (9,18%), *bla*KPC-2 (0,76%) e *bla*NDM (1,52%). Amplicons sequenciados
2768 foram depositados no NCBI para auxiliar pesquisas futuras. Este estudo revela uma
2769 frequência crítica do isolamento de *Enterobacteriaceae* que possuem genes
2770 plasmídicos de resistência antibacteriana isolados em animais, e que representam
2771 uma ameaça significativa à saúde.

2772 **Palavras-chave:** Beta-lactamases. Bactérias resistentes a antibióticos. *Escherichia*
2773 *coli*. *Klebsiella* spp. Multirresistente. *Proteus* spp.

2774 6.2 ABSTRACT

2775 The crisis of bacterial resistance is an emerging public health challenge, driven by the
2776 overuse of antimicrobials in several medical and agricultural settings. This study aimed
2777 to detect extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), Ampicillinases (AmpC), and
2778 carbapenemases production, and the presence of genes encoding these enzymes in
2779 *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus* spp., major contributors to infections and
2780 resistance isolates from animals. From 2016 to 2021, 130 multi-resistant (MDR) or
2781 extensively resistant (XDR) isolates were recovered from secretions, excretions, and
2782 organs of companion and production animals with active infection. Antibacterial
2783 sensitivity tests alongside phenotypic and genotypic detection of resistance enzymes
2784 were performed. To the best of our knowledge, this is the first study in Brazil that
2785 estimates XDR *Enterobacteriaceae* isolated in companion and production animals,
2786 reaching 13.8% of our samples. Statistical differences ($P \leq 0.05$) of resistance bacteria
2787 between different classes and inside the same class of antibacterials were found.
2788 Statistical probability between detection by genotypic detection for ESBL (OR = 3.1)
2789 and phenotypic tests for AmpC (OR = 2.3) was also established. About 32.3%, 17.6%,
2790 and 16.8% of the samples were positive in phenotypic tests for ESBL, AmpC, and one
2791 carbapenemase test, respectively. Genetic analysis revealed the presence of the
2792 *bla*CTX-M (60.0%), *bla*AmpC (9.18%) genes group, *bla*KPC-2 (0.76%) and *bla*NDM
2793 (1.52%). Sequenced amplicons were deposited in NCBI to aid future research. This
2794 study reveals a frequent criticism of the isolation of *Enterobacteriaceae* which possess
2795 plasmid antibacterial resistance genes isolated in animals, and that pose a significant
2796 One health threat.

2797 **Keywords:** Antibiotic-resistant bacteria. Beta-lactamases. *Escherichia coli*. *Klebsiella*
2798 spp. Multidrug resistant. *Proteus* spp.

2799 6.3 INTRODUCTION

2800 Antibiotic resistance is a natural characteristic of microorganisms,
2801 existing before antibiotics were identified, synthesized, or commercialized [1].
2802 However, the indiscriminate use of antimicrobials in clinical practice, both in human
2803 and veterinary medicine, the dissemination of these agents as growth promoters in
2804 production animals, and their use as prophylactic strategies contribute to the
2805 intensification of selective pressure on microorganisms [2]. As a result, there is an
2806 exponential emergence of antibiotic-resistant strains, including drugs considered as
2807 the last therapeutic option, such as carbapenems [3]. This situation represents an
2808 emerging challenge for global health, with estimates that within about 30 years, deaths
2809 from infections caused by resistant bacteria will surpass deaths from diabetes, heart
2810 diseases, and cancer as the leading cause [4].

2811 Among the main antibiotic-resistant bacteria, Gram-negative, the
2812 *Enterobacteriaceae* family, especially *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella* spp., and
2813 *Proteus* spp., stand out as the main responsible for hospital-acquired, community-
2814 acquired, and production animal infections [5, 6], and they exhibit notable resistance
2815 to drugs. The resistance of Gram-negative bacteria to antibiotics is mediated by
2816 modification of the target drug, alterations in membrane permeability, efflux pumps,
2817 and, most importantly, by mobile genetic elements [7, 8]. Intercellular mechanisms of
2818 genetic exchange include conjugation/mobilization, transduction, and transformation
2819 [9]. Plasmid-mediated conjugation transfer is the most common and effective way of
2820 spreading multidrug resistance, as most drug resistance genes are located on
2821 plasmids [10]. Enzymes that are transported by plasmids capable of inactivating
2822 antibacterial molecules stand out among all mechanisms of resistance to
2823 antibacterials, especially the different types of beta-lactamases [8].

2824 Beta-lactamases, hydrolytic enzymes that confer resistance to beta-
2825 lactams, the most relevant class of antibiotics in human and animal antibiotic therapy
2826 [11], can be encoded on multidrug resistance plasmids, making their spread in the
2827 environment easy [8,12] or on chromosomal pathways. Beta-lactamases of extended-
2828 spectrum (ESBL) (types SHV, TEM, OXA, and CTX-M), AmpC beta-lactamases, and
2829 carbapenemases (MBL, KPC, and class D oxacillinases) [6] are highlighted in
2830 resistance issues, being associated with therapeutic failure and increased mortality
2831 rates [7].

2832 Brazil is significant for the spread of resistance genes due to several
2833 biological, geographic, economic and social factors, mainly due to intensive agriculture
2834 and livestock [13], strong international trade of agricultural inputs [14] and high flow of
2835 migration and tourism [15]. In view of its role in resistance control, in 2018 it is published
2836 in Brazil the "National Action Plan for the Prevention and Control of Antimicrobial
2837 Resistance in the Context of One Health" (PAN-BR), aligned with the objectives
2838 defined by the Tripartite Alliance formed by the World Health Organization (WHO), the
2839 Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), and the World
2840 Organization for Animal Health (WOAH), as presented in the Global Action Plan on
2841 Antimicrobial Resistance [16]. Although humans, companion and production animals
2842 are known to be reservoirs of multidrug-resistant organisms [17], data on local,
2843 regional, and national prevalence remain underestimated and require continuous
2844 surveillance, with a lack of understanding the extent of resistance gene reservoirs in
2845 animals.

2846 Therefore, this study aimed to characterize the production of ESBL-,
2847 AmpC-, serine-type and metallo-beta-lactamase carbapenemases- and the detection
2848 of the respective genes by molecular biology techniques in *E. coli*, *Klebsiella* spp., and
2849 *Proteus* spp. isolated from secretion, excretion, and organs from companion and
2850 production animals from 2016 to 2021 in Brazil.

2851 6.4 MATERIALS AND METHODS

2852 This project was approved by the Ethics Committee on Animal Use of
2853 the State University of Londrina - CEUA/UEL, under protocol number 060.2021.

2854 6.4.1 Sample collection

2855 Biological samples, such as excretions (feces and urine), secretions
2856 (optic, nasal, milk, bile, and abdominal fluid), and organs (skin, blood, bladder mucosa,
2857 spleen, liver, kidney, endometrium, eye, and joint) were collected from canine, feline,
2858 bovine, equine, and Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*), showing clinical signs of
2859 active infection. The biological samples were sent to the Bacteriology Laboratory of the
2860 Veterinary Hospital located in the northern region of the state of Paraná, Brazil, over a
2861 six-year period (January 2016 to December 2021) to identify the bacterial agent and

2862 antimicrobial sensitivity profile. The samples were obtained from the clinical routine of
2863 the veterinary hospital where the laboratory is located, partner veterinary hospitals,
2864 and private requests from pet and production animal owners.

2865 A total of 130 multidrug-resistant [18] Gram-negative bacteria in the
2866 antibiogram after isolation on Mueller-Hinton Agar (MH) (Himedia Laboratories, India)
2867 enriched with 5% sheep blood and MacConkey Agar (Laborclin®, Pinhais, Brazil) were
2868 stored in Brain Heart Infusion broth (BHI) (Neogen, Lansing, USA) with 20% glycerol
2869 at -80°C until processing. A total of 100 samples were derived from excretions (feces
2870 $n=67$; urine $n=33$), 20 samples from organs (skin (6), bladder mucosa (3), blood (3),
2871 eye (2), spleen (2), endometrium (1), liver (1), kidney (1), synovial membrane (1)), and
2872 10 from secretions (optic (3), nasal (3), milk (2), bile (1), abdominal fluid (1)).

2873 The bacteria were identified through morphological evaluation of
2874 colonies and phenotypic biochemical tests [19]. Confirmation was done using the
2875 Bactray I System (Laborclin®, Pinhais, Brazil) [20,21].

2876 6.4.2 Antimicrobial Susceptibility Testing

2877 The selected samples were subjected to antimicrobial susceptibility
2878 testing (antibiogram) using MH agar by disk diffusion method, according to the Clinical
2879 and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M100 [22].

2880 A total of 30 antimicrobials belonging to the classes of
2881 aminoglycosides, phenicols, beta-lactams, macrolides, quinolones, sulfonamides, and
2882 tetracyclines, commonly used in veterinary medicine, were evaluated. The description
2883 of each antibiotic and concentration per disk can be found in Supplementary Table 1.
2884 A 24-hour grown culture of *E. coli* strain ATCC 25922, adjusted according to the 0.5
2885 McFarland turbidity scale and seeded on MH agar, was used as the standard control
2886 for the test. The results were interpreted according to CLSI (2022), Brazilian Committee
2887 on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST) (2022), and CLSI Veterinary (2020)
2888 guidelines [22,23,24].

2889 The isolates were classified as Multidrug Resistant (MDR), Extensively
2890 Drug Resistant (XDR), and Pan Drug Resistant (PDR) according to the classification
2891 proposed by Magiorakos et al. [18]. For this classification, intrinsic resistance to
2892 antibiotics of each bacterial species was excluded [25].

2893 6.4.3 Phenotypic Resistance Testing

2894 After being cultured on blood agar and MacConkey agar for
2895 morphological evaluation and on MH agar for susceptibility testing, the samples were
2896 subjected to phenotypic techniques for detection of antimicrobial resistance to
2897 carbapenemases by Modified Hodge Test (MHT), mCIM (Modified Carbapenem
2898 Inactivation Method), and eCIM (EDTA Carbapenem Inactivation Method), as well as
2899 production of ESBL and AmpC beta-lactamases, following specific protocols as
2900 described in in the literature.

2901 All tests were performed using negative control (*E. coli* ATCC 25922
2902 and *K. pneumoniae* ATCC 1706) and specific positive strain for each test control. ESBL
2903 detection was performed using the double-disk synergy method by disk diffusion as
2904 described by Jarlier et al. [26]. The test for AmpC-type beta-lactamase production was
2905 performed as reported by Peter-Getzlaff et al. [27], considering resistance to Cefoxitin
2906 (CFO, 30 µg) as a discriminative parameter for the presence of this resistance gene
2907 [28, 29]. The samples were subjected to the phenotypic test for carbapenemase
2908 production using the Modified Hodge Test (MHT) according to CLSI instructions [30].
2909 All samples were subjected to the modified carbapenemase inactivation test (mCIM)
2910 and the EDTA carbapenemase inactivation method (eCIM) as described and
2911 interpreted by Tsai et al. [31] and Rizvi et al. [32].

2912 6.4.4 Molecular analysis

2913 An in-house extraction was performed on all 130 samples. Samples
2914 were streaked on MH agar plates and incubated for at least 20 hours at 37°C. After
2915 this period, one to five colonies were transferred to 100 µl of ultrapure water (Samtec,
2916 São Paulo, Brazil) and lysed by heating at 95°C for 15 minutes. Cellular debris was
2917 removed by centrifugation at 10,500 x g for 2 minutes [33].

2918 All samples underwent genotypic confirmation of resistance using the
2919 polymerase chain reaction (PCR) technique. Five genes from the *bla*CTX-M group
2920 (M1, M2, M8, M9, and M25) were tested by multiplex PCR (mPCR) as previously
2921 described [34]. For the investigation of 26 AmpC genes (MOX-1, MOX-2, CMY-1,
2922 CMY-2, CMY-3, CMY-4, CMY-5, CMY-6, CMY-7, CMY-8, CMY-11, LAT-1, LAT-2,
2923 LAT-3, LAT-4, BIL-1, DHA-1, DHA-2, ACC, MIR-1T, ACT-1, FOX-1, FOX-2, FOX-3,

2924 FOX-4, and FOX-5b), an mPCR protocol was performed according to the details
2925 provided by Pérez and Hanson, [33].

2926 The detection of metallo-beta-lactamases metallo-imipenemase (IMP), German
2927 imipenemase (GIM), Seoul imipenemase (SIM), São Paulo metallo-beta-lactamase
2928 (SPM), and Verona Integron-encoded metallo-beta-lactamase (VIM) followed a
2929 conventional PCR protocol adapted by Mendes et al. [35], and blaNDM and blaOXA-
2930 48 genes using an mPCR protocol as described by Doyle et al. [36]. The detection of
2931 blaKPC-2 was performed by conventional PCR as described by Yigit et al. [37]. The
2932 PCR reactions were conducted as described in Supplementary Tables 2 (primers
2933 description, target genes, expected amplicon size, primers named), 3 (mix used in
2934 amplification protocols), and 4 (PCR and mPCR amplification protocols).

2935 6.4.5 DNA Purification and Sequencing

2936 The amplicons obtained in the PCR of the *bla*CTX-M1, *bla*CTX-M2,
2937 *bla*CTX-M8, *bla*CTX-M9, *bla*CMY-2, *bla*DHA, *bla*FOX, and *bla*KPC-2 genes were
2938 purified using the QIAquick® PCR purification kit (Qiagen, USA), quantified using
2939 Nanodrop Lite (Thermo Scientific NanoDrop® Lite Spectrophotometer, USA), and
2940 sequenced using the same PCR primers (Supplementary Table 2) and the BigDye
2941 Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher, USA), with the ABI3500
2942 Genetic Analyzer sequencer. The result was analyzed using the BioEdit program (Hall,
2943 1999) and the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, 2021) [38] to verify possible
2944 genomic mutations and analyzed in the Molecular Evolutionary Genetics Analysis
2945 (MEGA) program for deposition in a public genetic database. The sequence was
2946 deposited in the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI)
2947 for public access.

2948 6.4.6 Statistical Analysis

2949 The frequency of the biological origin of each sample, species, and
2950 isolated agent was expressed as a percentage and total number. To investigate
2951 statistical differences, the Fisher's Exact was used for correlation between pathogenic
2952 bacteria, phenotypic and genotypic analyses, and Odds Ratio (OR) will be used to
2953 analyze the probability of a bacterium being resistant to antibiotics of the same class,

2954 using RStudio 1.4.1106 software [39]. For all analyses, a significance level of 5% was
2955 used.

2956 6.5 RESULTS

2957 6.5.1 Frequency of isolates by host and bacterial species

2958 Bacteria *E. coli* was the more frequency 75.38% (98/130) of the
2959 isolates, while the genus *Klebsiella* spp. accounted for 21.53% (28/130) and *Proteus*
2960 spp. for 3.07% (4/130). The results of isolates by animal species are shown in Table
2961 1.

Table 1 – Distribution of bacterial isolation by animal species

Animal species	Percentage (%) of isolates (n)			Isolations (%) *	
	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Proteus</i> spp.	Positives	Negatives
Bovine	96.96% (64/66)	3.03 (2/66)	0% (0/66)	50.76% (66/130)	49.23% (64/130)
Canine	56.09% (23/41)	34.14% (14/41)	9.75% (4/41)	31.53% (41/130)	68.46% (89/130)
Feline	50.0% (6/12)	50.0% (6/12)	0% (0/12)	9.23% (12/130)	90.76% (118/130)
Equine	100% (4/4)	0% (0/4)	0% (0/4)	3.07% (4/130)	96.92% (126/130)
Nile tilapia	14.28% (1/7)	85.71% (6/7)	0% (0/7)	5.38% (7/130)	94.61% (123/130)
Total	75.38% (98/130)	21.53% (28/130)	3.07% (4/130)		

*Positive or negative for the species / total isolates.

2962 Samples from excretions showed a higher frequency of isolation of
2963 antibiotic-resistant bacteria (72.92%; 100/130) compared to isolations from organs
2964 (15.35%; 20/130) and secretions (7.69%; 10/130); however, no statistical difference
2965 was observed for the origin of isolation material ($P=0.21$). Additional information about
2966 the origin and resistance profile of samples are provided in Supplementary Table 5.

2967 The *E. coli* isolates were mostly recovered from excretions 91.83%
2968 (90/98), while frequency of *Klebsiella* spp. in secretions was about two times lower
2969 compared to those found in *E. coli* (46.42%; 13/28). It is understood that for the
2970 detection of ESBL genes in *Klebsiella* spp., organs (43.47%; 10/23) and even

2971 excretions (8.69%; 2/23) play as relevant a role. This genus also plays an important
2972 clinical role related to urinary system infection, and therefore, almost half of the
2973 *Klebsiella* spp. isolates that meet the criteria of this study were recovered from bladder
2974 mucosa or urine (43.47%; 10/23). Additionally, one-third of the samples (34.78%; 8/23)
2975 showed the classic resistance pattern associated with ESBL presence (resistance to
2976 1st, 3rd, and 4th generation cephalosporins, monobactams, and penicillins), with all
2977 these isolates testing positive in the enzyme detection test. However, 65.21%
2978 expressed disparate beta-lactam resistance patterns, signaling the possible presence
2979 of other resistance genes or even other antibiotic resistance mechanisms.

2980 Like in ESBL-positive isolates, the importance of excretory material in
2981 the dissemination of AmpC resistance genes is noted. Approximately 60% (63.63%;
2982 7/11) of these genes were detected in bacterial species isolated from urine. Moreover,
2983 90.90% (10/11) of detectable isolates originated from companion animals.

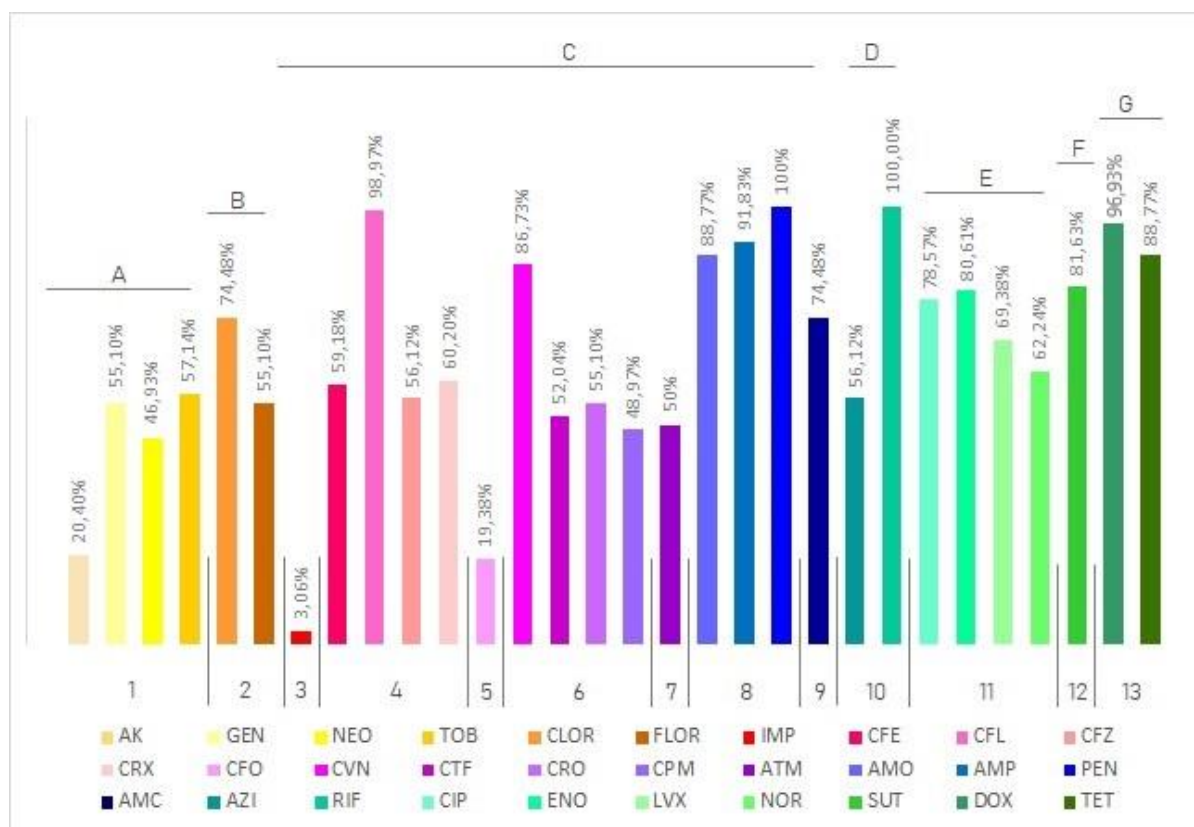
2984 There was an important increase in the last three years (2019 - 2021)
2985 of identification of MDR and XRD bacteria in the isolates compared to the initial period
2986 of the study (2016-2018). Approximately two-thirds (70.76%; 92/130) of the samples
2987 with an extended spectrum of resistance were isolated from the year 2019 onwards,
2988 contrasting with the preceding three years, in which only 38 (29.23%) samples
2989 exhibited this characteristic.

2990 *6.5.2 Antibacterial resistance, Multidrug resistance (MDR) and Extensively drug-* 2991 *resistant (XDR)*

2992 The preponderance of antibacterials with a significant incidence of resistance
2993 fell on beta-lactams. Among the most resistant were notably penicillin (100%;
2994 130/130), cephalothin (96.92%; 126/130), amoxicillin (90.76%; 118/130), and
2995 amoxicillin with clavulanic acid (75.38%; 98/130). Additionally, rifampicin, a macrolide
2996 (100%; 130/130), doxycycline, a tetracycline (90.0%; 117/130), and ciprofloxacin, a
2997 quinolone (79.23%; 103/130), also showed high levels of resistance. Particularly, all
2998 samples recovered in fish showed resistance to the analyzed macrolides (azithromycin
2999 and rifampicin) and penicillins (amoxicillin and penicillin), as well as to the phenicols
3000 (71.42%; 5/7), tetracyclines (71.42%; 5/7), quinolones (85.71%; 6/7), and other
3001 important representatives of the beta-lactam classes such as 1st (71.42%; 5/7), 2nd
3002 (42.85%; 3/7), and 3rd (57.14%; 4/7) generation cephalosporins.

3003 The representation of resistant isolates according to classes and categories for
 3004 defining multidrug resistance [18] for each antimicrobial agent by etiological agent is
 3005 shown in Figure 1 (*E. coli*), 2 (*Klebsiella spp.*), and 3 (*Proteus spp.*).

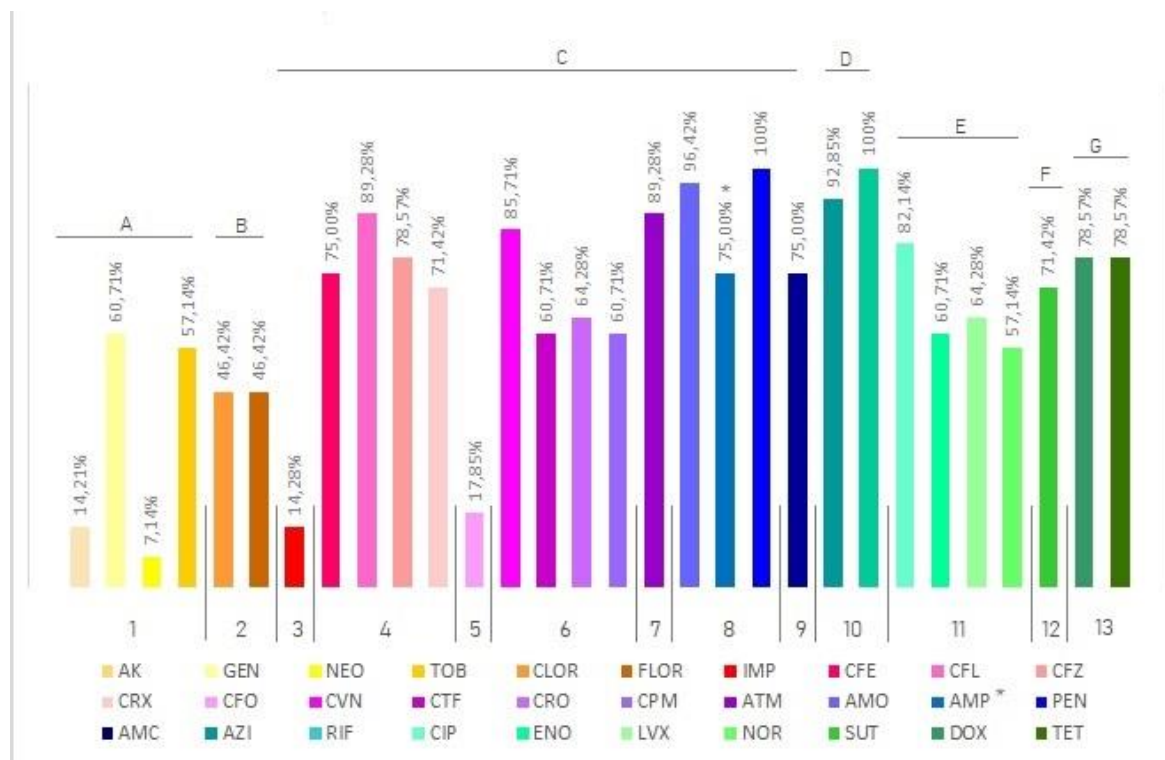
Figure 1 - Resistance of *Escherichia coli* isolates ($n=98$) to antimicrobial agents tested and separated by common classes (A-G) and by the division of antibiotic categories proposed by Magioarakos et al. (2012) [18] (1-13).



Antibiotics are presented according to classes (A: aminoglycosides, B: phenicols, C: beta-lactams, D: macrolides, E: quinolones, F: sulfonamides, and G: tetracyclines) and according to categories for defining multidrug resistance (1: aminoglycosides; 2: phenicols; 3: carbapenems; 4: first and second generation cephalosporins; 5: cephamycin; 6: third and fourth generation cephalosporins; 7: monobactams; 8: penicillins + beta-lactamase inhibitors; 9: penicillin [ampicillin]; 10: macrolides; 11: quinolones; 12: sulfonamides; 13: tetracyclines) according to Magiorakos et al. (2012) [15]*. The antibiotics are presented in the following order: amikacin (AK), gentamicin (GEN), neomycin (NEO), tobramycin (TOB), chloramphenicol (CLOR), florfenicol (FLOR), imipenem (IMP), cephalexin (CFE), cephalothin (CFL), cefazolin (CFZ), cefuroxime (CRX), cefoxitin (CFO), cefovecin (CVN), ceftiofur (CTF), ceftriaxone (CRO), cefepime (CPM), aztreonam (ATM), amoxicillin (AMO), ampicillin (AMP), penicillin (PEN), amoxicillin with clavulanic acid (AMC), azithromycin (AZI), rifampicin (RIF), ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENO), levofloxacin (LVX), norfloxacin (NOR), sulfamethoxazole + trimethoprim (SUT), doxycycline (DOX), and tetracycline (TET).

*Adapted.

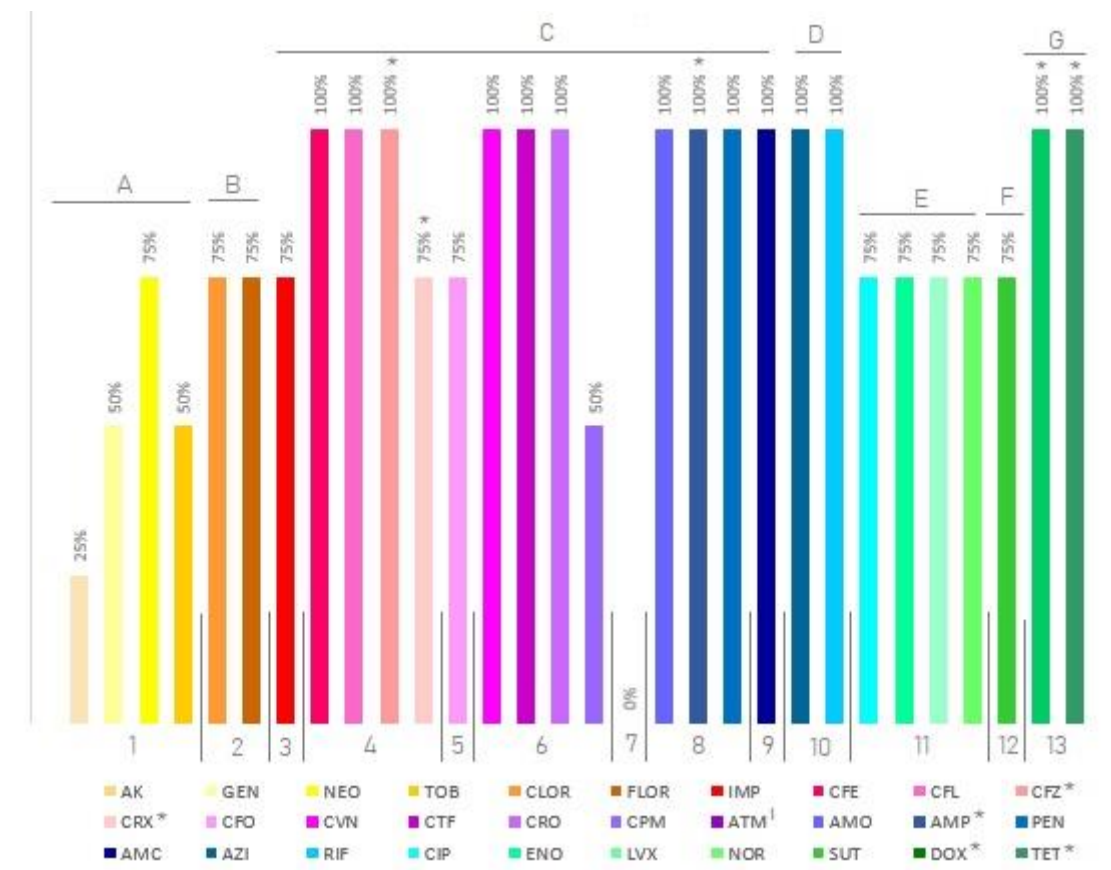
Figure 2 – Resistance of *Klebsiella* spp. isolates ($n=28$) to antimicrobial agents tested and separated by usual classes (A-G) and by the division of antibiotic categories proposed by Magiorakos et al. (2012) [18] (1-13).



Similarly to the antibiotic classification used in *E. coli*, antibiotics are presented according to classes (A: aminoglycosides, B: phenicols, C: beta-lactams, D: macrolides, E: quinolones, F: sulfonamides, and G: tetracyclines) and according to categories for defining multidrug resistance (1: aminoglycosides; 2: phenicols; 3: carbapenems; 4: first and second-generation cephalosporins; 5: cephamycins; 6: third and fourth-generation cephalosporins; 7: monobactams; 8: penicillins + beta-lactamase inhibitors; 9: penicillin [ampicillin]; 10: macrolides; 11: quinolones; 12: sulfonamides; 13: tetracyclines) according to Magiorakos et al. (2012) [15]. The antibiotics are presented in the following order: amikacin (AK), gentamicin (GEN), neomycin (NEO), tobramycin (TOB), chloramphenicol (CLOR), florfenicol (FLOR), imipenem (IMP), cephalexin (CFE), cephalothin (CFL), cefazolin (CFZ), cefuroxime (CRX), cefoxitin (CFO), cefovecin (CVN), ceftiofur (CTF), ceftriaxone (CRO), cefepime (CPM), aztreonam (ATM), amoxicillin (AMO), ampicillin (AMP), penicillin (PEN), amoxicillin with clavulanic acid (AMC), azithromycin (AZI), rifampicin (RIF), ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENO), levofloxacin (LVX), norfloxacin (NOR), sulfamethoxazole + trimethoprim (SUT), doxycycline (DOX), and tetracycline (TET).

* Intrinsic resistance to ampicillin.

Figure 3 – Resistance of *Proteus* spp. isolates ($n=4$) to antimicrobial agents tested and separated by usual classes (A-G) and by the division of antibiotic categories proposed by Magiorakos et al. (2012) [18] (1-13).



Similarly to the antibiotic classification used in *E. coli*, antibiotics are presented according to classes (A: aminoglycosides, B: phenicols, C: beta-lactams, D: macrolides, E: quinolones, F: sulfonamides, and G: tetracyclines) and according to categories for defining Multi-resistance (1: aminoglycosides; 2: phenicols; 3: carbapenems; 4: first and second-generation cephalosporins; 5: cephamycins; 6: third and fourth-generation cephalosporins; 7: monobactams; 8: penicillins + beta-lactamase inhibitors; 9: penicillin [ampicillin]; 10: macrolides; 11: quinolones; 12: sulfonamides; 13: tetracyclines) according to Magiorakos et al. (2012) [15] for classification into (MDR, XDR, and PDR). The antibiotics are presented in the following order: amikacin (AK), gentamicin (GEN), neomycin (NEO), tobramycin (TOB), chloramphenicol (CLOR), florfenicol (FLOR), imipenem (IMP), cephalixin (CFE), cephalothin (CFL), ceftazidime (CFZ), cefuroxime (CRX), cefoxitin (CFO), ceftiofur (CTF), ceftriaxone (CRO), cefepime (CPM), aztreonam (ATM), amoxicillin (AMO), ampicillin (AMP), penicillin (PEN), amoxicillin with clavulanic acid (AMC), azithromycin (AZI), rifampicin (RIF), ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENO), levofloxacin (LVX), norfloxacin (NOR), sulfamethoxazole + trimethoprim (SUT), doxycycline (DOX), and tetracycline (TET).

* Intrinsic resistance of the genus to ceftazidime, cefuroxime, ampicillin, doxycycline, and tetracycline.

¹ All isolates were sensitive to aztreonam (ATM).

3006 The total number of isolates classified as MDR, XDR, and PDR is
 3007 presented in Table 2. The percentage of MDR and XDR isolates is less than 15% for
 3008 both *E. coli* and *Klebsiella* spp. On the other hand, *Proteus* spp. exhibited an XDR
 3009 profile in half of the analyzed samples.

Table 2 – Isolates classified as multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) by bacterial species isolated.

Isolate	Percentage (%) of positive (n)	
	MDR (#)	XDR
<i>Escherichia coli</i>	87,75% (86/98)	12,24% (12/98)
<i>Klebsiella spp.</i>	85,71% (24/28)	14,28% (4/28)
<i>Proteus spp.</i>	50,00% (2/4)	50,00 (2/4)
Total	86,15% (112/130)	13,84% (18/130)

(#) MDR (multidrug-resistant), XDR (extensively drug-resistant)

3010 There was a statistical difference in the resistance of *E. coli* to
 3011 treatment with carbapenems, cephamycins, and monobactams when comparing
 3012 antibiotic efficacy between classes (Table 3). Overall, aminoglycosides and quinolones
 3013 showed similar resistance capabilities across all their representatives. For *Klebsiella*
 3014 *spp.*, besides treatment with carbapenems, cephamycins showed the lowest
 3015 percentage of resistance. Treatment with aminoglycosides and monobactams was
 3016 considered a secondary option. Macrolides and penicillins statistically performed the
 3017 worst for treating MDR and XDR pathogens. It was not possible to perform Fisher's
 3018 exact test for *Proteus spp.* due to the number of isolates.

Table 3 – Percentage of pathogenic agents resistant by classes according to Magiorakos et al. (2012) [18] classification.

Class of Antibiotics	Antibiotic Class Resistance (%)	
	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella spp.</i>
Aminoglycosides	83,67 ^{DEF}	64,29 ²
Phenicols	77,55 ^D	78,57 ²³
Carbapenems	3,06 ^A	14,29 ¹
1° and 2° Generation Cephalosporins	98,98 ^G	89,29 ³⁴
Cephamycin	19,39 ^B	17,86 ¹
3° and 4° Generation Cephalosporins	92,86 ^{FG}	89,29 ³⁴
Monobactams	50,0 ^C	64,29 ²
Penicillins	100,00 ^G	100,00 ⁴
Penicillin + beta-lactamase inhibitor	74,49 ^D	75,00 ²³
Macrolides	100,00 ^G	100,00 ⁴
Quinolones	85,71 ^{DEF}	89,29 ³⁴

Sulfonamides	81,63 ^{DE}	71,43 ²³
Tetracyclines	98,98 ^G	82,14 ²³

A, B, C, D, E, F, G in the same column indicate statistical difference ($P \leq 0.05$; Fisher's exact test) for *E. coli*.
1, 2, 3, 4 in the same column indicate statistical difference ($P \leq 0.05$; Fisher's exact test) for *Klebsiella* spp.

3019 There was also a statistical difference ($P \leq 0.05$) in the ability of *E. coli*
3020 and *Klebsiella* spp. resist treatment with different antibiotics within the same class.
3021 Table 4 shows how often the resistance capacity among antibiotics is compared to the
3022 least resistant antibiotic in the class. Among first and second-generation
3023 cephalosporins, for the treatment of *E. coli*, cephalothin had 74.56 times more chance
3024 of being resistant when compared to cefazolin (the least resisted in the class) and was
3025 about three times more resistant when used in treatment against *Klebsiella* spp.
3026 Among third and fourth generation cephalosporins, cefovecin had the capacity to resist
3027 *E. coli* about 6 times and *Klebsiella* spp. about three times more than cefepime. A total
3028 of 120 samples (92.30%; 120/130) isolated in this study were resistant to at least one
3029 of the representatives of third-generation cephalosporin.

3030 No statistical difference was found in infections caused by *Klebsiella*
3031 spp. when treated with first to fourth generation cephalosporins. Additionally, it is
3032 possible to observe that the chance of an animal being resistant to Chloramphenicol is
3033 the same as being resistant to Florfenicol, as well as the probability being equal for
3034 Doxycycline and Tetracycline in an infection caused by *Klebsiella* spp. (OR = 1).

Table 4 – Resistance of *E. coli* and *Klebsiella* spp. to antibiotics within classes and resistance capacity by comparison.

Antibiotic	<i>E. coli</i>		<i>Klebsiella</i> spp.	
	% of R ^(*)	OR (x) ^(#)	% of R ^(*)	OR (x) ^(#)
Aminoglycosides				
Amikacin	20,41 ^A	-	14,29 ^a	2,13
Gentamicin	55,10 ^B	4,74	60,71 ^b	18,88
Neomycin	46,94 ^B	3,42	7,14 ^a	-
Tobramycin	57,14 ^B	5,15	57,14 ^b	16,37
Phenicol				
Chloramphenicol	74,49 ^B	2,36	46,43 ^a	1
Florfenicol	55,10 ^A	-	46,43 ^a	-
1° and 2° generation cephalosporins				
Cephalexin	59,18 ^A	1,13	75,00 ^a	1,19
Cephalothin	98,98 ^B	74,56	89,29 ^a	3,26
Cefazolin	56,12 ^A	-	78,57 ^a	1,45
Cefuroxime	60,20 ^A	1,18	71,43 ^a	-
3° and 4° generation cephalosporins				

Cefovecin	86,73 ^B	6,73	85,71 ^a	3,78
Ceftiofur	52,04 ^A	1,12	60,71 ^a	-
Ceftriaxone	55,10 ^A	1,27	64,29 ^a	1,16
Cefepime	48,98 ^A	-	60,71 ^a	1,02
Penicillins				
Amoxicillin	88,78 ^B	2,69	96,43 ^b	8,69
Amoxicillin/clavulanic acid	74,49 ^A	-	75,00 ^a	-
Ampicillin	91,83 ^B	3,82	89,28 ^a	3,00
Penicillin	100 ^C	INF	100,00 ^b	INF
Macrolides				
Azithromycin	56,12 ^A	-	92,85 ^a	-
Rifampin	100 ^B	INF	100,00 ^a	INF
Quinolones				
Ciprofloxacin	78,57 ^b	2,21	82,14 ^a	3,37
Enrofloxacin	80,61 ^b	2,50	60,71 ^a	1,15
Levofloxacin	69,39 ^{ab}	1,37	64,29 ^a	1,34
Norfloxacin	62,24 ^a	-	57,14 ^a	-
Tetracyclines				
Doxycycline	96,94 ^B	3,97	78,57 ^a	1
Tetracycline	88,78 ^A	-	78,57 ^a	-

(*) Percentage (%) of Resistances

(#) Probability of resistance to an antibiotic compared to others in the same class using the least resistant as the baseline.

OR: Odds Ratio.

A, B or a, b in the same column indicates a statistical difference ($P \leq 0.05$; Fisher's exact test).

INF = infinite, since the resistance percentage is 100%, there is no possibility of calculating comparative resistance chance.

3035 6.5.3 Phenotypic tests

3036 At least 30% of the samples (32.30%; 42/130) was verified the
 3037 production of extended-spectrum beta-lactamases. Regarding the AmpC predictive
 3038 test, approximately one-fifth of the isolates (17.69%; 23/130) showed resistance to
 3039 cefoxitin. In this study, there was no detection of ESBL genes in isolates of the genus
 3040 *Proteus* spp., being negative in both phenotypic and genotypic tests.

3041 About the detection of carbapenemases by enzymatic production, the
 3042 MHT presented positive results in 6.15% of the isolates (8/130). Additionally, the mCIM
 3043 method was positive in 5.38% of the isolates (7/130) and interpreted as intermediate
 3044 in 8.46% (11/130). In turn, the eCIM was positive in 12.30% (16/130) of the cases, as
 3045 shown in Table 5.

Table 5 – Percentage of positive samples in phenotypic tests by bacterial isolate species

Isolates	Average percentages / Isolates (n)				
	(#) ESBL	AmpC	MHT	mCIM	eCIM
<i>E. coli</i>	28,57%	16,32%	3,06%	11,22%	12,24%

	(28/98)	(16/98)	(3/98)	(11/98)	(12/98)
<i>Klebsiella</i> spp.	50,0%	14,28%	3,57%	25,0%	10,71%
	(14/28)	(4/28)	(1/28)	(7/28)	(3/28)
<i>Proteus</i> spp.	0% (0/4)	75,0% (3/4)	100% 4/4	0% (0/4)	25,0% (1/4)

(#) ESBL (Extended-spectrum beta-lactamase), AmpC (AmpC beta-lactamase), MHT (Modified Hodge Test), mCIM (Modified Carbapenem Inactivation Method), and eCIM (EDTA carbapenem inactivation method).

3046 6.5.4 Genotypic tests and Sequencing

3047 The CTX-M group beta-lactamase genes, used as markers for ESBL
3048 presence, were detected in 60.0% (78/130) of the isolates, with the following
3049 frequencies: *bla*CTX-M-1 (53), *bla*CTX-M-2 (24), *bla*CTX-M-8 (7), and *bla*CTX-M-9 (9).
3050 In Table 6, it is observed the distribution of *E. coli* isolates positive for the CTX-M group,
3051 with *bla*CTX-M genes found in more than half of the samples (56.12%; 55/98), and in
3052 four out of the five animal species analyzed. The pattern of resistance to the beta-
3053 lactam group assigned by ESBL was evident. Regarding *Klebsiella* spp., the presence
3054 of *bla*CTX-M group genes was observed in 82.14% (23/28) of the isolates. Similar to
3055 *E. coli*, the most frequently detected gene was *bla*CTX-M1 (Table 7).

Table 6 – Characteristics of ESBL-positive isolates detected in animal biological samples (*E. coli*)

<i>E. coli</i> (ID)	Animal species	Biological sample	Detected beta-lactamase encoding genes (<i>bla</i> CTX-M)	Pattern of resistance to beta-lactams (#)	Phenotypic ESBL	Classification of resistance scope
129	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-1	1	Negative	MDR
179, 335	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-1	2	Positive	MDR
188	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-1	3	Positive	MDR
304, 307, 314, 344	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-1	2	Negative	MDR
321	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-1	4	Negative	MDR
169	Canine	Urine	<i>bla</i> CTX-M-1	4	Positive	MDR
398	Canine	Synovial membrane	<i>bla</i> CTX-M-1	5	Positive	XRD
442, 663, 721, 722	Canine	Urine	<i>bla</i> CTX-M-1	2	Positive	MDR
651	Canine	Dermal wound	<i>bla</i> CTX-M-1	6	Positive	MDR
730	Canine	Urine	<i>bla</i> CTX-M-1	7	Negative	MDR
284	Feline	Bile	<i>bla</i> CTX-M-1	2	Positive	MDR
350	Feline	Urine	<i>bla</i> CTX-M-1	6	Positive	MDR
670, 738	Feline	Urine	<i>bla</i> CTX-M-1	2	Positive	MDR
672	Feline	Urine	<i>bla</i> CTX-M-1	2	Positive	XDR
296	Equine	Endometrium	<i>bla</i> CTX-M-1	6	Positive	XDR
185	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-1 + <i>bla</i> CTX-M-2	2	Positive	MDR
634	Canine	Urine	<i>bla</i> CTX-M-1 + <i>bla</i> CTX-M-2	8	Negative	MDR
178	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-1 + <i>bla</i> CTX-M-8	2	Positive	MDR
644	Canine	Abdominal fluid	<i>bla</i> CTX-M-1 + <i>bla</i> CTX-	6	Positive	MDR

			M-9			
56	Equine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-1 + <i>bla</i> CTX-M-9	2	Positive	MDR
63	Equine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-1 + <i>bla</i> CTX-M-9	2	Positive	XDR
175	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-1 + <i>bla</i> CTX-M-2 + <i>bla</i> CTX-M-8	2	Positive	MDR
182	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-1 + <i>bla</i> CTX-M-2 + <i>bla</i> CTX-M-8	2	Negative	MDR
59	Equine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-1 + <i>bla</i> CTX-M-2 + <i>bla</i> CTX-M-9	2	Positive	XDR
123, 124, 162, 163, 315, 320	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-2	9	Negative	MDR
172, 197	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-2	2	Positive	MDR
219	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-2	10	Negative	MDR
310	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-2	2	Negative	XDR
311, 312	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-2	2	Negative	MDR
323	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-2	4	Positive	MDR
696	Canine	Urine	<i>bla</i> CTX-M-2	2	Positive	MDR
271	Canine	Blood	<i>bla</i> CTX-M-2 + <i>bla</i> CTX-M-8	6	Negative	XDR
194	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-2 + <i>bla</i> CTX-M-9	2	Positive	MDR
225	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-8	9	Negative	MDR
228	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-8	2	Negative	MDR
229	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-8	4	Negative	MDR
193	Bovine	Feces	<i>bla</i> CTX-M-9	4	Positive	XDR

388, 389	Canine	Urine	<i>bla</i> CTX-M-9	6	Negative	MDR
387	Feline	Urine	<i>bla</i> CTX-M-9	6	Negative	XDR

(#) Resistant to **(1)** 1° generation Cephalosporins + Penicillins; **(2)** 1°, 3° and 4° generation Cephalosporins + Monobactams + Penicillins; **(3)** Carbapenems + 1°, 3° and 4° generation Cephalosporins + Monobactams + Penicillins; **(4)** 1°, 3° and 4° generation Cephalosporins + Penicillins; **(5)** Carbapenems + 1°, 2°, 3° and 4° generation Cephalosporins + Monobactams + Penicillins; **(6)** 1°, 2°, 3° and 4° generation Cephalosporins + Monobactams + Penicillins; **(7)** 1° generation Cephalosporins + Monobactams + Penicillins; **(8)** 1°, 2°, 3° generation Cephalosporins + Penicillins; **(9)** 1° and 3° generation Cephalosporins + Penicillins; **(10)** 1° and 3° generation Cephalosporins + Monobactams + Penicillins.

Table 7 – Characteristics of ESBL-carrying isolates detected in animal biological samples (*Klebsiella* spp.)

<i>Klebsiella</i> spp. (ID)	Animal species	Biological sample	Detected beta-lactamase encoding genes (<i>bla</i> CTX-M)	Pattern of resistance to beta-lactams (#)	Phenotypic ESBL	Classification of resistance scope
M9	Bovine	Milk	<i>bla</i> CTX-M-1	1	Positive	MDR
104, 371	Canine	Bladder mucosa	<i>bla</i> CTX-M-1	1	Positive	MDR
347	Canine	Otologic secretion	<i>bla</i> CTX-M-1	2	Negative	MDR
623	Canine	Bladder mucosa	<i>bla</i> CTX-M-1	3	Positive	MDR
627	Canine	Urine	<i>bla</i> CTX-M-1	4	Positive	XDR
646	Canine	Urine	<i>bla</i> CTX-M-1	1	Positive	MDR
649	Canine	Cardiac muscle	<i>bla</i> CTX-M-1	1	Positive	MDR
660	Canine	Nasal secretion	<i>bla</i> CTX-M-1	5	Negative	MDR
681	Canine	Otologic secretion	<i>bla</i> CTX-M-1	6	Negative	MDR
737	Canine	Skin wound	<i>bla</i> CTX-M-1	1	Positive	MDR
742	Canine	Skin wound	<i>bla</i> CTX-M-1	3	Negative	MDR
743	Canine	Nasal secretion	<i>bla</i> CTX-M-1	4	Positive	XDR
24, 383	Feline	Urine	<i>bla</i> CTX-M-1	1	Positive	MDR
275	Feline	Skin wound	<i>bla</i> CTX-M-1	1	Positive	MDR
391	Feline	Urine	<i>bla</i> CTX-M-1	7	Positive	MDR
497	Feline	Urine	<i>bla</i> CTX-M-1	9	Negative	XDR
641	Feline	Urine	<i>bla</i> CTX-M-1	1	Positive	XDR
650	Tilapia	Eye	<i>bla</i> CTX-M-1	6	Negative	MDR
678	Tilapia	Kidney	<i>bla</i> CTX-M-1 + <i>bla</i> CTX-M-2	6	Negative	MDR
M35	Bovine	Milk	<i>bla</i> CTX-M-2	8	Negative	MDR
705	Tilapia	Spleen	<i>bla</i> CTX-M-2	10	Negative	MDR

(#) Resistant to **(1)** 1°, 3° and 4 generation Cephalosporins + Monobactam + Penicillins; **(2)** 3° generation Cephalosporin + Penicillins; **(3)** 1°, 2°, 3° and 4 generation Cephalosporins + Penicillins; **(4)** 1°, 2°, 3° and 4° generation Cephalosporins + Monobactam + Penicillins; **(5)** 1° and 3° generation Cephalosporins + Penicillins; **(6)** 1° and 3° generation Cephalosporins + Monobactam + Penicillins; **(7)** Carbapenem + 1°, 3° and 4° generation Cephalosporins + Monobactam + Penicillins; **(8)** Carbapenem + 1° and 3° generation Cephalosporins + Penicillins; **(9)** Carbapenem + 1°, 2°, 3° and 4° generation Cephalosporins + Monobactam + Penicillins; **(10)** Penicillins.

3057 About 8.46% (11/130) of isolates had one of AmpC gene researched
 3058 genetically identified. No AmpC detection was observed in any *Klebsiella* spp. isolate
 3059 selected for this study. The results of the plasmidial AmpC group research are
 3060 described in Table 8.

Table 8 – Characteristics of isolates carrying AmpC group genes detected in animal biological samples.

Isolate (ID)	Animal species	Biological sample	Gene	Pattern of resistance to beta-lactams (#)	Classification of resistance scope
<i>E. coli</i> 271	Canine	Blood	CMY	1	XDR
<i>E. coli</i> 283	Canine	Urine	CMY	1	XDR
<i>E. coli</i> 302, 393	Canine	Urine	CMY	2	MDR
<i>E. coli</i> 387	Feline	Urine	CMY	1	XDR
<i>E. coli</i> 388	Canine	Urine	CMY	1	MDR
<i>E. coli</i> 634	Canine	Urine	CMY	3	MDR
<i>E. coli</i> 644	Canine	Abdominal fluid	DHA	1	MDR
<i>E. coli</i> 708	Tilapia	Spleen	FOX	1	XDR
<i>Proteus</i> spp. 276	Canine	Urine	CMY	4	XDR
<i>Proteus</i> spp. 655	Canine	Skin wound	CMY	3	MDR

(#) Resistant to **(1)** 1°, 2°, 3° and 4° generation Cephalosporins + Monobactam + Penicillins; **(2)** 1°, 2° and 3° generation cephalosporins + Monobactam + Penicillins; **(3)** 1°, 2° and 3° generation Cephalosporins + Penicillins; **(4)** Carbapenem + 1°, 2°, 3° and 4° generation cephalosporins + Penicillins.

3061 Regarding carbapenemase detection, the *bla*KPC-2 gene was
 3062 identified in one *Klebsiella* spp. isolate (0.76%; 1/130) from a feline's urine. In two
 3063 isolates, originating from dermal wounds and otologic secretions, both from canines,
 3064 the *bla*NDM gene was identified (Table 9). No positive detections were observed for
 3065 the *bla*OXA-48, *bla*IMP, *bla*GIM, *bla*SIM, *bla*SPM, and *bla*VIM genes in any of the
 3066 samples analyzed.

Table 9 – Characteristics of isolates carrying carbapenemases detected in animal biological samples.

Isolate (ID)	Biological sample	Gene	MHT	mCIM	eCIM	Classification of resistance scop
<i>E. coli</i> 25	Urine	-	-	+	-	MDR

<i>E. coli</i> 123	Feces	-	+	-	-	MDR
<i>E. coli</i> 129	Feces	-	-	+	+	MDR
<i>E. coli</i> 163	Feces	-	-	-	+	MDR
<i>E. coli</i> 169	Urine	-	-	+	-	MDR
<i>E. coli</i> 182	Feces	-	-	+	-	MDR
<i>E. coli</i> 302	Urine	-	+	-	-	MDR
<i>E. coli</i> 306	Feces	-	-	-	+	MDR
<i>E. coli</i> 312	Feces	-	-	-	+	MDR
<i>E. coli</i> 328	Feces	-	-	-	+	MDR
<i>E. coli</i> 331	Feces	-	-	+	+	MDR
<i>E. coli</i> 334	Feces	-	-	-	+	MDR
<i>E. coli</i> 336	Feces	-	-	+	+	MDR
<i>E. coli</i> 338	Feces	-	-	-	+	MDR
<i>E. coli</i> 343	Feces	-	-	+	+	MDR
<i>E. coli</i> 393	Urine	-	-	+	-	MDR
<i>E. coli</i> 398	Synovial membrane	-	-	+	-	MDR
<i>E. coli</i> 634	Urine	-	-	+	-	MDR
<i>E. coli</i> 644	Abdominal fluid	-	-	+	-	MDR
<i>E. coli</i> 672	Urine	-	+	-	-	XDR
<i>E. coli</i> 722	Urine	-	-	-	+	MDR
<i>E. coli</i> 730	Urine	-	-	-	+	MDR
<i>Klebsiella</i> spp. 371	Bladder mucosa	-	-	+	-	MDR
<i>Klebsiella</i> spp. 383	Urine	-	-	+	+	MDR
<i>Klebsiella</i> spp. 497	Urine	<i>blaKPC</i>	+	+	+	XDR
<i>Klebsiella</i> spp. 627	Urine	-	-	+	-	XDR
<i>Klebsiella</i> spp. 641	Urine	-	-	+	-	MDR
<i>Klebsiella</i> spp. 742	Skin wound	<i>blaNDM</i>	-	+	-	MDR
<i>Klebsiella</i> spp. 743	Otologic secretion	<i>blaNDM</i>	-	+	-	XDR
<i>Proteus</i> spp. 107	Skin wound	-	+	-	-	XDR
<i>Proteus</i> spp. 276	Urine	-	+	-	+	XDR
<i>Proteus</i> spp. 655	Skin wound	-	+	-	-	MDR
<i>Proteus</i> spp. 719	Nasal secretion	-	+	-	-	MDR

3067 Considering all the genes analyzed in this study, in 13.07% (17/130) of the
3068 isolates, more than one resistance gene was detected. In six isolates (4.61%), all of
3069 them *E. coli*, three resistance genes were detected (Table 10). The amplicons obtained
3070 for the detection of the genes *blaCTX-M1*, *blaCTX-M2*, *blaCTX-M8*, *blaCTX-M9*,
3071 *blaDHA*, *blaKPC* and *blaCYM* were sequenced for gene identity analysis,
3072 determination of similarity with similar strains, and possible mutations in beta-
3073 lactamases. The sequences with respective descriptions have been deposited in
3074 GenBank under the identification indicated in the in supplementary table 6.

Table 10 – Profile of isolates for detectable resistance genes.

Isolate (ID)	Animal species	Biological sample	Gene 1 (<i>bla</i>)	Gene 2 (<i>bla</i>)	Gene 3 (<i>bla</i>)
<i>E. coli</i> 56	Equine	Feces	CTX-M-1	CTX-M-9	-
<i>E. coli</i> 59	Equine	Feces	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-9
<i>E. coli</i> 63	Equine	Feces	CTX-M-1	CTX-M-9	-
<i>E. coli</i> 175	Bovine	Feces	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8
<i>E. coli</i> 178	Bovine	Feces	CTX-M-1	CTX-M-8	-
<i>E. coli</i> 182	Bovine	Feces	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8
<i>E. coli</i> 185	Bovine	Feces	CTX-M-1	CTX-M-2	-
<i>E. coli</i> 194	Bovine	Feces	CTX-M-2	CTX-M-9	-
<i>E. coli</i> 271	Canine	Blood	CTX-M-2	CTX-M-9	CMY
<i>E. coli</i> 387	Feline	Urine	CTX-M-9	CMY	-
<i>E. coli</i> 388	Canine	Urine	CTX-M-9	CMY	-
<i>E. coli</i> 634	Canine	Urine	CTX-M-1	CTX-M-2	CMY
<i>E. coli</i> 644	Canine	Abdominal fluid	CTX-M-1	CTX-M-9	DHA
<i>Klebsiella</i> spp. 497	Feline	Urine	CTX-M-1	KPC	-
<i>Klebsiella</i> spp. 678	Tilapia	Kidney	CTX-M-1	CTX-M-2	-
<i>Klebsiella</i> spp. 742	Canine	Skin wound	CTX-M-1	NDM	-
<i>Klebsiella</i> spp. 743	Canine	Otologic secretion	CTX-M-1	NDM	-

3075 The amplicons obtained for the detection of the genes *bla*CTX-M1,
3076 *bla*CTX-M2, *bla*CTX-M8, *bla*CTX-M9, *bla*DHA, *bla*KPC and *bla*CYM were sequenced
3077 for gene identity analysis, determination of similarity with similar strains, and possible
3078 mutations in beta-lactamases. The sequences with respective descriptions have been
3079 deposited in GenBank under the identification indicated in the in supplementary table
3080 7.

3081 6.5.5 Comparison between resistance pattern, phenotypic and genotypic tests

3082 Despite presenting diverse resistance patterns attributed to the
3083 presence of ESBL, resistance to cephalosporins in the antimicrobial sensitivity test is
3084 a constant, present in 98.71% of isolates (77/78) in which the presence of *bla*CTX-M
3085 group genes was detected.

3086 There was a statistically significant difference ($P \leq 0.05$; Fisher's exact
3087 test) in ESBL detection by phenotypic test, able to detect in 42 of 78 samples detected
3088 by molecular methods (OR test = 3.1 molecular test). Regarding *E. coli*, of the 55

3089 isolates which were detected CTX-M group genes, only 28 (50.90%) exhibited classical
3090 phenotypic expression. Although there was presence of one or more genes from the
3091 group, enzyme production was not always detected (negative for phenotypic test in
3092 49.09%; 27/55), indicating that the sensitivity of the phenotypic test for ESBL
3093 production was low. Similar to the phenotypic detection in *E. coli*, in almost half of the
3094 samples of *Klebsiella* spp. (39.13%; 9/23), there was no expression of the enzyme
3095 detected by the phenotypic test. The test was able to detect 60.86% (14/23) of the 23
3096 isolates in which at least one gene of the CTX-M group was detected. However,
3097 extended resistance pattern in the antimicrobial sensitivity test was notice, even if
3098 caused by multiple resistance factors. More than 15% of isolates positive in genetic
3099 detection of this genus (17.39%; 4/23) exhibited an XDR pattern.

3100 The genotypic identification of the AmpC group followed the
3101 phenotypic expression for this gene group. There was also statistically significant
3102 difference in detection of AmpC contrasting phenotypic detection (23/130) over
3103 molecular (11/130) in AmpC test (OR = 2.3 phenotypic test) indicating that the
3104 probability of a positive result in the search for this beta-lactamase through resistance
3105 to cefoxitin in phenotypic tests.

3106 It was noteworthy that phenotypic test results showed discrepancies
3107 compared to the evaluated genes to carbapenemase (Table 9).

3108 6.6 DISCUSSION

3109 The results of this study revealed the predominance of MDR bacteria,
3110 as identified in veterinary medical records or routine antibiotic susceptibility test
3111 reports. The most frequently used classes of antibiotics in animals are aminopenicillins,
3112 first- to four-generation cephalosporins, tetracyclines, sulfonamides, macrolides, and
3113 quinolones [40], capable of managing an environment with selection pressure that
3114 results in high resistance indices [41]. Representing a significant portion, *E. coli* was
3115 identified most frequently with MDR or XDR characteristics, accounting for two-thirds
3116 of the isolates. According to the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System
3117 (GLASS) report of 2022, alarming rates of an average of 42% of *E. coli* resistant to
3118 third generation cephalosporins were reported in 76 countries [42]. In Brazil, this
3119 number is stated in 10 to 20% of isolates of this specie [43-89], while our samples
3120 reached around 88%. Also, *Klebsiella* spp. which corresponds one in five of our

3121 samples, has the resistance against third-generation cephalosporins estimated in 40-
3122 50% of samples in Brazil [43], but in this study achieved percentage around 85%.

3123 Notable frequencies of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* strains
3124 were reported worldwide [44] with very different rates of ESBL production. In our study,
3125 production of ESBL was detected in 32.30% (42/130) of isolates. Lower rates were
3126 described in Taiwan (22.8%;65/283) and United States (27.08%;13/48) and higher was
3127 found in Netherlands (44.61%; 29/75) and Cape Verde (48.0%; 48/100) in companion
3128 animals [45,46,47,48]. To production animals variations are even more distinguish.
3129 Rates of 3.33% (5/150) was described in Australia [49] while 76.4% (196/259) of
3130 samples were capable of production of ESBL in South Africa [50]. In this study, no
3131 ESBL-producing *E. coli* and *Klebsiella* spp. were found in fish, which differs greatly
3132 from the previous results of Sivaraman et al. where 68.35% (54/79) of *E. coli* and
3133 15.18% (12/79) of *Klebsiella* spp. isolated in fish were positive in phenotypic tests [51].
3134 The distribution of *Enterobacteriaceae* with wide variance across different areas
3135 worldwide suggests that determinate isolates express specific types of enzymes that
3136 are better adapted to some environments and geographical regions, with specific
3137 implications and recommendations for the local community [52]. In Brazil,
3138 *Enterobacteriaceae* ESBL producing rates were described between 10.8% to 44.34%
3139 from companion animals [53,54,55]. In production animals, lower rates of 1.77% to
3140 4,65% were described from milk sample and neonates with diarrhea [56,57] and higher
3141 rates of 42,7% to 61.54% reported for cattle suffering from mastitis [58,59]. While
3142 Sfaciotte et al. [55] describes about 5% (4/73) *Proteus* spp. isolates producing ESBL.
3143 In contrast, Dos Santos et al. did not found any ESBL-producing *Proteus* spp. [54], a
3144 finding aligned with the results of this study. Also, no ESBL producers were found in
3145 fish by Almeida et al. [60], as described in this research.

3146 *Bla*CTX-M group is predominant and the most widespread ESBL gene
3147 type [61], found in 60% (78/130) of isolates in this study. *Bla*CTX-M-1 gene shown the
3148 highest frequency, present in almost have of the samples (67.94%; 53/78). *Bla*CTX-
3149 M-1, *bla*CTX-M-2, *bla*CTX-M-8, and *bla*CTX-M-55 have been detected in animal
3150 groups in Paraná state before [17]. However, Melo et al., Campos et al. and Nobrega
3151 et al. expose detection of *bla*CTX-M2 and *bla*CTX-M8 at least twice until thirty-seven
3152 times smaller (27.27%; 1.8%; 1.7%, respectively) in disease dogs [53], bovine with
3153 mastitis [58] and herds of Brazilian dairy cows [56] in different Brazilian states that the
3154 found in our study (30.76% to CTX-M2 and 8.97% to CTX-M8, respectively). *Bla*CTX-

3155 M-15 also is recorded in different states in companion animals in *Enterobacteriaceae*
3156 in Brazil [53,62,63,64,65], including bacterial strains commonly isolates in human
3157 infections [64]. In South American countries, including Brazil, a specific ESBL
3158 epidemiology can be observed, with CTX-M-2 and CTX-M-8 being far more prevalent
3159 than on other continents [53].

3160 Considering the three etiological agents analyzed in the present study,
3161 the sensitivity of the ESBL production test was low compared to genotypic testing with
3162 53.84% (42/78) *E. coli* and 60.86% *Klebsiella* spp. (14/23) phenotypically detected,
3163 statistical significance ($P \leq 0.05$; Fisher's exact test) highlighting molecular detection,
3164 and OR = 3.1 times higher capacity than to molecular ESBL detection. For AmpC,
3165 there was also a statistically significant difference, contrasting phenotypic detection
3166 over molecular, with the OR indicating that the probability of a positive result in the
3167 search for AmpC through resistance to cefoxitin is 2.3 times higher in phenotypic tests.
3168 Gene expression regulation can be influenced by environmental conditions, the
3169 presence of specific signals, the concentration of certain compounds, and even the
3170 physiological state of the cell. In the context of antibiotic resistance genes, in some
3171 cases, the expression of resistance genes may be suppressed in the absence of the
3172 target antibiotic. This may be part of a mechanism for energy conservation for the
3173 bacterial cell, which avoids expressing unnecessary genes when there is no immediate
3174 selective pressure [66].

3175 In this study, 17.69% (23/130) of isolates phenotypically positive to
3176 AmpC were found. In 2015, Bogaerts et al. reported a rate of 3.6% (22/608) of
3177 phenotypically positive *Enterobacteriaceae* for AmpC in a study that included 10
3178 European countries [67]. About fifteen years later, rates of 22.5% (27/120), 32.38%
3179 (34/105) and 32.8 (41/125) were described in France, Germany and Italy, respectively
3180 reporting until tenfold increase of AmpC-producing isolates in companion and
3181 production animals [68,69,70]. Sivaraman et al., in India, detected 1.15% in fish (1/66)
3182 *Enterobacteriaceae* isolated productive AmpC [51], twelve times less than what was
3183 detected in this study for the same species (14.28%; 1/7). In Brazil, Melo et al. reported
3184 the isolation of 40.90% (18/44) positive for phenotypic AmpC production in from dogs
3185 and cats [53]. Almeida et al. relate 50% (3/6) phenotypic AmpC detections in fish in
3186 *Enterobacteriaceae* [60]. On the other hand, Santos et al. recovered *E. coli*, *Klebsiella*
3187 spp., and *Proteus* spp. from companion animals but did not isolate any AmpC
3188 producers [54]. Contrary to phenotypic expression of ESBL, the resistance to cefoxitin

3189 showed higher sensitivity than genotypic detection and was able to determine the
3190 genes involved in 47.82% (11/23) of the isolates. In this study, we aimed to genetically
3191 identify the most frequent of plasmid mediated AmpC. However, more than 20 different
3192 AmpCs mediated by plasmids have already been described [71]. This result indicates
3193 the possibility of the existence of other variants of AmpC present in the samples. It also
3194 suggests that other resistance mechanisms, both intrinsic and acquired, may be
3195 influencing the expression of this resistance.

3196 The CMY gene is the most widely disseminated AmpC worldwide [72].
3197 A two-year follow-up study, covering 10 European countries, reported that 45.45%
3198 (10/22) of non-natural chromosomal AmpC producers (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P.*
3199 *mirabilis*) expressed a plasmid-encoded CMY-2 AmpC type [67]. This study reveals
3200 8.46% (11/130) isolates positive for AmpC gene. In Brazil, there studies with low
3201 detections of AmpC genes in samples (0,9%; 1/110) [58] until rates of 59.09% (26/44)
3202 [53]. However, despite the epidemiological significance [68, 73], there is a noticeable
3203 lack of studies focusing on AmpC plasmids in *Enterobacteriaceae* in companion and
3204 production animals.

3205 Nineteen years elapsed between the beginning of carbapenem use in
3206 the veterinary market in Brazil [74] and the first report of carbapenemase in an animal
3207 infection, which occurred in 2018 in an *E. coli* isolated from a dog [75]. Brazil is
3208 considered endemic for the spread of carbapenemase, with the epidemiology of
3209 producers varying geographically [76]. The presence of KPC- and NDM-positive
3210 samples isolated from animals, such as found in this study (2.3%; 3/130), alerts to the
3211 growing emergence of carbapenemase-producing pathogens isolated [77],
3212 considering that this class belong to the highest priority group for the development of
3213 new treatment options and are resistant to the best antibacterial available [78]. In this
3214 study, 33 samples were positive for some of the phenotypic carbapenemase detection
3215 tests. However, only 10% had their presence confirmed by PCR/mPCR. The difference
3216 in sensitivity and specificity between the tests justifies the result [22-25,31]. Besides,
3217 there are variants beyond those addressed in this work that may not be detected by
3218 specific molecular methods.

3219 At the local level, a study on the resistance profile of bacteria isolated
3220 from samples of dogs and cats, also conducted in Paraná state about 15 years ago
3221 (2008-2009), demonstrated that the frequency of MDR *E. coli* and *Klebsiella* spp. was
3222 much lower than that found currently (16.6%; 30/181 and 1.7%; 3/181) [79]. Ten years

3223 later, in a second study in the same state, a similar frequency to that found in 2011
3224 was observed for *E. coli* (13.75%; 11/80), but 3.6-fold increase of MDR of *Klebsiella*
3225 spp. (6.25%; 5/80) [80]. Comparing the findings of Souza et al. [80] to the current study,
3226 the frequency of MDR isolation is 5.8 and 3.44 times higher for *E. coli* and *Klebsiella*
3227 spp., respectively. MDR *Proteus* spp. maintained the frequency in both studies (9.9%;
3228 18/181; Ishii et al. and 10.0%; 8/80; Souza et al., respectively [79,80], which contrasts
3229 with the findings of this study by a frequency about one-third lower (3.07%; 4/130). The
3230 southern region of Brazil it is a hot spot in the technology of products of animal origin
3231 at world level [90]. Besides, intensive agriculture and livestock focused mainly on the
3232 export of agricultural products it is one of the primary activities of the Brazilian economy
3233 [14], which favors an environment of bacterial selection pressure and its maintenance
3234 in the environment [90].

3235 Our samples present an MDR standard (86.15%) with two to ten times
3236 rates that described by other studies in the country in companion and production
3237 animals [58, 63, 81]. About 13% our samples were XDR. To the best of our knowledge,
3238 there is no specific study in Brazil that reports XDR bacteria isolated from animals. The
3239 resistance to penicillin in all the isolates included in this study was not surprising.
3240 Discovered almost 100 years ago, resistance to this antibiotic was demonstrated in
3241 laboratory mutants shortly after its introduction into clinical use [82]. Despite cefovecin
3242 being a relatively recent addition to veterinary medications [83, 84], this study found a
3243 high resistance rate to the drug, with 86.92% (113/130) of the samples showing
3244 resistance. In contrast, even after 75 years since its description [85], neomycin showed
3245 one of the lowest percentages of resistance (60.76%; 51/130), especially against
3246 *Klebsiella* spp. (7.14%; 2/28). When compared to Ishii et al. [79], the resistance to
3247 cephalothin increased by about 1.5 times (from 61.5% to 96.92%), while amoxicillin
3248 and amoxicillin + clavulanic acid resistance increased by about 1.1 times (from 64.0%
3249 to 90.76% and from 68.0% to 75.38%, respectively). Resistance to ciprofloxacin
3250 increased by 1.9 times (from 42.8% to 79.23%). Although in *Klebsiella* spp. infection,
3251 first to fourth generation cephalosporins do not show statistical difference in the
3252 percentage of resistant isolates within the classes, the high OR values (3.26 and 3.78;
3253 Table 4), suggest that if more data were available, there would be statistical difference.

3254 Plasmids responsible for beta-lactamase enzymes often carry genes
3255 encoding resistance to other classes of drugs, such as aminoglycosides, trimethoprim,
3256 and fluoroquinolones [61, 62] which can explain high level of the resistance found in

3257 this study to other classes of antibiotics besides beta-lactams. Besides that, some
3258 beta-lactamases and carbapenemases can also cause resistance to others class of
3259 antibacterial molecules beyond beta-lactams, especially when combined with other
3260 resistance mechanisms, such as loss of porins or efflux mechanisms [86]. Salgado
3261 Calixto et al. describe that individual treated with antibacterial up to 12 months before
3262 antibiogram have a 15 times greater chance of carrying *E. coli* resistant to
3263 cephalosporins, for example, demonstrating that previous exposure to antibiotics is
3264 also a factor to be considered at high levels of resistance [87]. This justifies the unusual
3265 pattern of resistance to beta-lactams found in this study for ESBL detection and AmpC
3266 positive samples.

3267 In this study, samples from companion animals accounted for 43.84%
3268 (57/130) of resistant isolates. Several analysis investigating companion animals have
3269 monitored the dissemination of resistant *Enterobacteriaceae* by beta-lactamases in
3270 Brazil [53-55, 62,65, 75, 79, 87-89]. Access to complex individual treatment protocols
3271 with exposure to broad-spectrum antimicrobials, longer hospitalization periods and
3272 increased complexity procedures explains the contribution of companion animals in
3273 the increase of multidrug-resistant pathogens [91]. Additionally, the increase in
3274 interactions between humans and companion animals, especially during the pandemic
3275 of COVID-19, has rase the risk of nosocomial infections caused by resistant bacteria
3276 in veterinary hospital settings, concomitantly the risks in human hospitals [74, 92].

3277 Over half of the isolates (73/130) were recovered production animals,
3278 and several factors may explain the high frequency in the detection of resistance.
3279 Firstly, Brazil is a major producer and exporter of animal-derived foods [13]. In second
3280 place, although the practice has been prohibited for some antibacterials since 1998,
3281 traditionally, in livestock farming, antibacterials are used for prophylactic measures and
3282 as growth promoters, besides treatment of infectious diseases [93]. Additionally, there
3283 is a common practice of metaphylaxis in an attempt to limit the spread of a particular
3284 pathogen [94]. The inefficient use of broad-spectrum antibacterial, commonly
3285 administered unnecessarily is also a contributing factor. Lastly, sub-lethal doses of
3286 antibiotics and narrow-spectrum antibiotics for treating diseases caused by pre-
3287 resistant agents act as selective pressure, driving bacterial evolutionary machinery to
3288 adapt to environmental stressors [95, 96]. All Nile tilapia recovered showed resistance
3289 to penicillins (amoxicillin and penicillin) and macrolides, in addition to a high resistance
3290 rate to phenicols, tetracyclines, quinolones, and first, second, and third generation

3291 cephalosporins, even though in Brazil tetracycline and florfenicol are the only
3292 antibiotics approved use in fish treatment [97, 98]. It is important to note that third and
3293 fourth-generation cephalosporins, macrolides, and quinolones are three of the seven
3294 antibiotic classes listed by the WHO as critically important for human medicine [99] and
3295 that antimicrobial compounds are inadequately employed in aquaculture, significantly
3296 intensifying the influence on the emergence and dissemination of antimicrobial
3297 resistance [95].

3298 6.7 CONCLUSION

3299 The presence of MDR or XDR *E. coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus*
3300 spp., carrying ESBL and carbapenemases, in secretions, excretions, and organs of
3301 canines, felines, equines, bovines, and fish in Brazil, poses a significant threat to public
3302 health. *Enterobacteriaceae* included in this study showed high resistance rates to
3303 representatives of beta-lactam subclasses, except for carbapenems and cephamycins.
3304 Additionally, there was a statistically significant difference in the effective use of
3305 bacterial agents among antibiotics within the same class, with different chances of
3306 resistance, with a significant number of the samples exhibiting an XDR pattern. These
3307 bacterial pathogens can transfer resistance genes to other environmental pathogens,
3308 highlighting their role in the One Health threat, which requires continuous surveillance
3309 of the antibiotic resistance status aiming for effective treatment and mitigation
3310 strategies against this imminent crisis.

3311 6.8 REFERENCES

- 3312 1. Morrison L, Zembower TR (2020) Antimicrobial Resistance. *Gastrointest Endosc*
3313 *Clin N Am* 30: 619–635. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.004>
- 3314 2. PAHO (2023) Antimicrobial Resistance, Fueled by the COVID-19 Pandemic.
3315 <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55864>. Accessed 09 December 2023
- 3316 3. Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V (2017) Antimicrobial resistance: A
3317 global emerging threat to public health systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* 57: 2857–287.
3318 <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>
- 3319 4. WHO (2023) Antimicrobial resistance. [https://www.who.int/antimicrobial-](https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/)
3320 [resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/](https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/). Accessed 05 May 2022

- 3321 5. Iredell J, Brown J, Tagg K (2016) Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*:
3322 mechanisms and clinical implications. *BMJ* 352: h6420.
3323 <https://doi.org/10.1136/bmj.h6420>
- 3324 6. Dandachi I, Chabou S, Daoud Z, Rolain, JM (2018) Prevalence and Emergence of
3325 Extended-Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram-
3326 Negative Bacteria of Animal Origin in the Mediterranean Basin. *Front Microbiol* 9: 2299.
3327 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02299>
- 3328 7. Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R (2020) Resistance of Gram-Negative Bacteria to
3329 Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules* 25:1340.
3330 <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
- 3331 8. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi
3332 Y, Spencer J (2019) β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J*
3333 *Mol Biol* 431:3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- 3334 9. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen, SO (2018) Mobile Genetic Elements
3335 Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 31: e00088-17.
3336 <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- 3337 10. Tao S, Chen H, Li N, Wang T, Liang W. (2022) The Spread of Antibiotic Resistance
3338 Genes In Vivo Model. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2022:
3339 3348695. <https://doi.org/10.1155/2022/3348695>
- 3340 11. Lima LM, Silva BNMD, Barbosa G, Barreiro EJ (2020) β -lactam antibiotics: An
3341 overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem* 208:112829.
3342 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>
- 3343 12. Paterson DL (2006) Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*.
3344 *Am J Infect Control* 34: S20-S73. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.238>
- 3345 13. Rabello RF, Bonelli RR, Penna BA, Albuquerque JP, Souza RM, Cerqueira AMF
3346 (2020) Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update
3347 Overview. *Animals* 10:552. <https://doi.org/10.3390/ani10040552>
- 3348 14. Brasil (2024) 38 new certified meat production facilities boost Brazil's exports to
3349 China. Planalto. Latest News 04.2024. [https://www.gov.br/planalto/en/latest-
3350 news/2024/04/38-new-certified-meat-production-facilities-boost-brazils-exports-to-
3351 china](https://www.gov.br/planalto/en/latest-news/2024/04/38-new-certified-meat-production-facilities-boost-brazils-exports-to-china). Accessed 17 June 2024.
- 3352 15. Brasil (2024) Historic record: international tourism injects US\$6.9 billion into the
3353 Brazilian economy in 2023. Planalto. Latest News 02.2024.
3354 https://www.gov.br/planalto/en/latest-news/2024/02/copy2_of_historic-record-

- 3355 [international-tourism-injects-us-6-9-billion-into-the-brazilian-economy-in-2023](#).
3356 Accessed 17 June 2024.
- 3357 16. Brazil (2023) National Action Plan for the Prevention and Control of Antimicrobial
3358 Resistance within the Scope of One Health 2018-2022. www.saude.gov.br/svs.
3359 Accessed 12 December 2023.
- 3360 17. Tseng CH, Liu CW, Liu PY (2023) Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL)
3361 Producing Bacteria in Animals. *Antibiotics* 12:661.
3362 <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040661>
- 3363 18. Magiorakos, AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG,
3364 Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB,
3365 Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL (2012) Multidrug-
3366 resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international
3367 expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol*
3368 *Infect* 18:268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- 3369 19. Brazil (2013) Clinical microbiology for the control of healthcare-related infections.
3370 Module 6: Detection and identification of bacteria of medical importance. National
3371 Health Surveillance Agency (ANVISA), Brasilia
- 3372 20. Costa CF, Monteiro Neto V, Santos BR, Costa BR, Azevedo A, Serra JL, Mendes
3373 HB, Nascimento AR, Mendes MB, Kuppinger O. (2014) *Enterobacteria* identification
3374 and detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in a Port Complex. *Braz J Microbiol*
3375 45:945–952. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000300026>
- 3376 21. Vásquez-García A, Silva TS, Queiroz SRA, Godoy SHS, Fernandes AM, Sousa
3377 RLM, Franzolin R (2017) Species identification and antimicrobial susceptibility profile
3378 of bacteria causing subclinical mastitis in buffalo. *Pesq Vet Bras* 37:447-452.
3379 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000500004>
- 3380 22. CLSI (2022) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI
3381 supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne
- 3382 23. BrCAST (2022) Cutoff point tables for interpreting MICs and halo diameters.
3383 <https://brcast.org.br/documentos/documentos-3/>. Accessed 15 December 2022.
- 3384 24. CLSI (2021). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution
3385 Susceptibility tests for Bacteria Isolated from Animals. CLSI supplement VET01S.
3386 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne
- 3387 25. Eucast. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease.
3388 <https://www.eucast.org/newsiandr>. Accessed 08 September 2022.

- 3389 26. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. (1988) Extended broad-spectrum
3390 beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in
3391 *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 10:
3392 867–878. <https://doi.org/10.1093/clinids/10.4.867>
- 3393 27. Peter-Getzlaff S, Polsfuss S, Poledica M, Hombach M, Giger J, Böttger EC,
3394 Zbinden R, Bloemberg GV (2011) Detection of AmpC beta-lactamase in *Escherichia*
3395 *coli*: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. *J Clin*
3396 *Microbiol* 49: 2924–2932. <https://doi.org/10.1128/JCM.00091-11>
- 3397 28. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Böttger EC, Hombach M (2011)
3398 Practical approach for reliable detection of AmpC beta-lactamase-producing
3399 *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 49:2798–2803.
3400 <https://doi.org/10.1128/JCM.00404-11>
- 3401 29. Liu Y, Yang Y, Chen Y, Xia Z (2017) Antimicrobial resistance profiles and
3402 genotypes of extended-spectrum β -lactamase and AmpC β -lactamase-producing
3403 *Klebsiella pneumoniae* isolated from dogs in Beijing, China. *J Glob Antimicrob Resist*
3404 10: 219–222. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.06.006>
- 3405 30. CLSI (2011) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing:
3406 Twenty-First Informational Supplement. CLSI supplement M100. Clinical and
3407 Laboratory Standards Institute, Wayne
- 3408 31. Tsai YM, Wang S, Chiu HC, Kao C., Wen LL (2020) Combination of modified
3409 carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic
3410 detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *BMC Microbiol* 20:315.
3411 <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02010-3>
- 3412 32. Rizvi M, Sami H, Azam M, Ben Khalid D, Al Jabri Z, Khan F, Sultan A, Singh A,
3413 Perween N, Al Quraini M, Al Muharrmi Z, Rizvi SG (2021) Reliability of carbapenem
3414 inactivation method (CIM) and modified carbapenem inactivation method (mCIM) for
3415 detection of OXA-48-like and NDM-1. *Indian J Med Microbiol* 39:451–456.
3416 <https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2021.07.004>
- 3417 33. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND (2002) Detection of plasmid-mediated AmpC beta-
3418 lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:2153–
3419 2162. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002>
- 3420 34. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ (2006) Multiplex PCR for rapid detection of
3421 genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *J Antimicrob*
3422 *Chemother* 57:154–155. <https://doi.org/10.1093/jac/dki412>

- 3423 35. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gale AC,
3424 Pignatari AC, Tufik S (2007) Rapid detection and identification of metallo-beta-
3425 lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve
3426 analysis. *J Clin Microbiol* 45:544–547. <https://doi.org/10.1128/JCM.01728-06>
- 3427 36. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD (2012) Laboratory
3428 detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol* 50:
3429 3877–3880. <https://doi.org/10.1128/JCM.02117-12>
- 3430 37. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward
3431 CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC (2001) Novel carbapenem-hydrolyzing beta-
3432 lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella*
3433 *pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1151–1161.
3434 <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>
- 3435 38. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment
3436 search tool. *J. Mol. Biol* 215:403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- 3437 39. R Core Team (2023) R: A language and environment for statistical computing. R
3438 Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org>. Accessed 10
3439 June 2023.
- 3440 40. Caneschi A, Bardhi A, Barbarossa A, Zaghini A (2023) The Use of Antibiotics and
3441 Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine, a Complex Phenomenon: A Narrative
3442 Review. *Antibiotics* 12:487. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030487>
- 3443 9841. Tello A, Austin B, Telfer TC (2012) Selective pressure of antibiotic pollution on
3444 bacteria of importance to public health. *Environmental health perspectives* 120:1100–
3445 1106. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104650>
- 3446 42. GLASS. (2022) Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System:
3447 Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System: report 2022.
3448 <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702>. Accessed 01 December
3449 2023.
- 3450 43. Antimicrobial Resistance Collaborators (2022) Global burden of bacterial
3451 antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 399:629–655.
3452 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- 3453 44. WHO (2023) Antimicrobial resistance. Available online: [https://www.who.int/news-](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance)
3454 [room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance). Accessed 05 December 2023.
- 3455 45. Huang YH, Kuan NL, Yeh KS (2020) Characteristics of Extended-Spectrum β -
3456 Lactamase-Producing *Escherichia coli* From Dogs and Cats Admitted to a Veterinary

- 3457 Teaching Hospital in Taipei, Taiwan From 2014 to 2017. *Front Vet Sci* 7:395.
3458 <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00395>
- 3459 46. Elias L, Gillis DC, Gurrola-Rodriguez T, Jeon JH, Lee JH, Kim TY, Lee SH, Murray
3460 SA, Ohta N, Scott HM, Wu J, Rogovskyy AS (2019) The Occurrence and
3461 Characterization of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia*
3462 *coli* Isolated from Clinical Diagnostic Specimens of Equine Origin. *Animals* 10:28.
3463 <https://doi.org/10.3390/ani10010028>
- 3464 47. Dierikx CM, Van Duijkeren E, Schoormans AHW, Van Essen-Zandbergen A,
3465 Veldman K, Kant A, Huijsdens XW, Van der Zwaluw K, Wagenaar JA, Mevius DJ
3466 (2012) Occurrence and characteristics of extended-spectrum- β -lactamase- and
3467 AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *J*
3468 *Antimicrob Chemother* 67:1368–1374. <https://doi.org/10.1093/jac/dks049>
- 3469 48. Matos A, Cunha E, Baptista L, Tavares L, Oliveira M (2023) ESBL-Positive
3470 *Enterobacteriaceae* from Dogs of Santiago and Boa Vista Islands, Cape Verde: A
3471 Public Health Concern. *Antibiotics* 12:447.
3472 <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030447>
- 3473 49. Messele YE, Alkhalawi M, Veltman T, Trott DJ, McMeniman JP, Kidd SP, Low W
3474 Y, Petrovski KR (2022) Phenotypic and Genotypic Analysis of Antimicrobial Resistance
3475 in *Escherichia coli* Recovered from Feedlot Beef Cattle in Australia. *Animals* 12:2256.
3476 <https://doi.org/10.3390/ani12172256>
- 3477 50. Montso KP, Dlamini SB, Kumar A, Ateba CN (2019) Antimicrobial Resistance
3478 Factors of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia*
3479 *coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Cattle Farms and Raw Beef in North-
3480 West Province, South Africa. *Biomed Res Int* 2019:4318306.
3481 <https://doi.org/10.1155/2019/4318306>
- 3482 51. Sivaraman GK, Sudha S, Muneeb KH, Shome B, Holmes M, Cole J (2020)
3483 Molecular assessment of antimicrobial resistance and virulence in multi drug resistant
3484 ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from food fishes, Assam,
3485 India. *Microb Pathog* 149:104581. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104581>
- 3486 52. Perestrelo S, Amaro A, Brouwer MSM, Clemente L, Ribeiro ASD, Kaesbohrer A,
3487 Karpíšková R, Lopez-Chavarrias V, Morris D, Prendergast D, Pista A, Silveira L,
3488 Skarżyńska M, Slowey R, Veldman KT, Zając M, Burgess C, Alvarez J (2023) Building
3489 an International One Health Strain Level Database to Characterise the Epidemiology
3490 of AMR Threats: ESBL-AmpC Producing *E. coli* as An Example-Challenges and

- 3491 Perspectives. *Antibiotics* 12:552. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030552>
- 3492 53. Melo LC, Oresco C, Leigue L, Netto HM, Melville PA, Benites NR, Saras E, Haenni
3493 M, Lincopan N, Madec JY (2018) Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-
3494 producing *Enterobacteriaceae* in healthy and diseased companion animals in
3495 Brazil. *Vet Microbiol.* 221:59–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.05.017>
- 3496 54. Dos Santos JP, de Souza VFM, Santos MWDC, Dos Santos JN, Dos Santos NS,
3497 de Oliveira AP, Rodrigues VTDS, Carneiro IO, Vieira LCADS (2021) Antimicrobial
3498 resistance profile of extended-spectrum beta-lactamases, adenosine-monophosphate-
3499 cyclic, and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria isolated from domestic
3500 animals. *Vet World* 14:3099–3104. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.3099-3104>
- 3501 55. Sfaciotte RAP, Parussolo L, Melo FD, Wildemann P, Bordignon G, Israel ND,
3502 Leitzke M, Wosiacki SR, Salbego FZ, da Costa UM, Ferraz SM (2021) Identification
3503 and Characterization of Multidrug-Resistant Extended-Spectrum Beta-Lactamase-
3504 Producing Bacteria from Healthy and Diseased Dogs and Cats Admitted to a
3505 Veterinary Hospital in Brazil. *Microb Drug Resist* 27:855–864.
3506 <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0043>
- 3507 56. Nobrega DB, Calarga AP, Nascimento LC, Chande Vasconcelos CG, de Lima E
3508 M, Langoni H, Brocchi M (2021) Molecular characterization of antimicrobial resistance
3509 in *Klebsiella pneumoniae* isolated from Brazilian dairy herds. *J Dairy Sci.* 104:7210–
3510 7224. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19569>
- 3511 57. Mainardi RM, Costa AR, Chideroli RT, Favero LM, Alfieri AA, Pereira UP (2021)
3512 Resistance profile and virulence characterization of *Escherichia coli* isolated from
3513 diarrheic neonatal farm animals. *Semina.* 42:735-746. [https://doi.org/10.5433/1679-
3514 0359.2021v42n2p735](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n2p735)
- 3515 58. Campos FC, Castilho IG, Rossi BF, Bonsaglia ÉCR, Dantas STA, Dias RCB,
3516 Fernandes Júnior A, Hernandes, RT, Camargo, CH, Ribeiro MG, Pantoja JCF, Langoni
3517 H, Rall VLM (2022) Genetic and Antimicrobial Resistance Profiles of Mammary
3518 Pathogenic *E. coli* (MPEC) Isolates from Bovine Clinical Mastitis. *Pathogens* 11:1435.
3519 <https://doi.org/10.3390/pathogens11121435>
- 3520 59. Sierra TAO, Acosta AC, de Melo RPB, de Oliveira PRF, de Moraes Peixoto R,
3521 Cavalcanti EFTSF, Junior JWP, Mota RA (2023) Occurrence of extended-spectrum β -
3522 lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in raw milk from cows with subclinical
3523 mastitis in northeast Brazil. *Braz J Microbiol* 54:1303–1307.
3524 <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00955-x>

- 3525 60. Almeida MVA, Cangussú ÍM, Carvalho ALS, Brito ILP, Costa RA. Drug resistance,
3526 AmpC- β -lactamase and extended-spectrum β -lactamase-producing
3527 *Enterobacteriaceae* isolated from fish and shrimp. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 59:
3528 e70. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759070>
- 3529 61. Paterson DL, Bonomo RA (2005) Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical
3530 update. *Clin Microbiol Rev* 18:657–686. [https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-](https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005)
3531 686.2005
- 3532 62. Sartori L, Sellera FP, Moura Q, Cardoso B, Cerdeira L, Lincopan N (2019)
3533 Multidrug-resistant CTX-M-15-positive *Klebsiella pneumoniae* ST307 causing urinary
3534 tract infection in a dog in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist* 19:96–97.
3535 <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.003>
- 3536 63. Silva BA, do Amarante VS, Xavier RGC, Colombo SA, da Silva TF, Brenig B,
3537 Aburjaile FF, Azevedo VAC, Silva ROS (2024) Characterization of ESBL/AmpC-
3538 producing extraintestinal *Escherichia coli* (ExPEC) in dogs treated at a veterinary
3539 hospital in Brazil. *Res Vet Sci* 166:105106. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.105106>
- 3540 64. da Silva LCBA, Cardoso B, Fontana H, Esposito F, Cortopassi SRG, Sellera FP,
3541 Lincopan N (2022) Human pandemic K27-ST392 CTX-M-15 extended-spectrum β -
3542 lactamase-positive *Klebsiella pneumoniae*: A one health clone threatening companion
3543 animals. *One Health* 15:100414. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2022.100414>
- 3544 65. Silva CP, Oliveira CJB, Leite EL, Cibulski SP, Fernandes M, Vasconcelos PC, Dias
3545 LM, Silva NMVD, Garino Júnior F, Fernandes ACC (2022) CTX-M-15-producing
3546 *Klebsiella pneumoniae* ST273 associated with nasal infection in a domestic cat. *J Glob*
3547 *Antimicrob Resist* 28:203–205. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.01.004>
- 3548 66. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P (2007) Modes and
3549 modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev* 20:79–114.
3550 <https://doi.org/10.1128/CMR.00015-06>
- 3551 67. Bogaerts P, Huang TD, Bouchahrouf W, Bauraing C, Berhin C, El Garch F,
3552 Glupczynski Y, ComPath Study Group (2015) Characterization of ESBL- and AmpC-
3553 Producing *Enterobacteriaceae* from Diseased Companion Animals in Europe. *Microb*
3554 *Drug Resist* 21:643–650. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0284>
- 3555 68. Garcia-Fierro R, Drapeau A, Dazas M, Saras E, Rodrigues C, Brisse S, Madec JY,
3556 Haenni M (2022) Comparative phylogenomics of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-
3557 producing *Klebsiella pneumoniae* originating from companion animals and humans. *J*
3558 *Antimicrob Chemother* 77:1263–1271. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac041>

- 3559 69. Homeier-Bachmann T, Kleist JF, Schütz AK, Bachmann L (2022) Distribution of
3560 ESBL/AmpC-*Escherichia coli* on a Dairy Farm. *Antibiotics* 11:940.
3561 <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070940>
- 3562 70. Piccolo FL, Belas A, Foti M, Fisichella V, Marques C, Pomba C (2020) Detection
3563 of multidrug resistance and extended-spectrum/plasmid-mediated AmpC beta-
3564 lactamase genes in *Enterobacteriaceae* isolates from diseased cats in Italy. *J Feline*
3565 *Med Surg* 22:613–622. <https://doi.org/10.1177/1098612X19868029>
- 3566 71. Meini S, Tascini C, Cei M, Sozio E, Rossolini GM (2019) AmpC β -lactamase-
3567 producing *Enterobacteriales*: what a clinician should know. *Infection* 47:363–375.
3568 <https://doi.org/10.1007/s15010-019-01291-9>
- 3569 72. Palmeira JD, Cunha MV, Carvalho J, Ferreira H, Fonseca C, Torres RT (2021)
3570 Emergence and Spread of Cephalosporinases in Wildlife: A Review. *Animals* 11:1765.
3571 <https://doi.org/10.3390/ani11061765>
- 3572 73. Sampaio JL, Gales AC (2016) Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in
3573 Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol* 47:31-37.
3574 <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.002>
- 3575 74. Sellera FP, Da Silva LCBA, Lincopan N (2021) Rapid spread of critical priority
3576 carbapenemase-producing pathogens in companion animals: a One Health challenge
3577 for a post-pandemic world. *J Antimicrob Chemother* 76:2225–2229.
3578 <https://doi.org/10.1093/jac/dkab169>
- 3579 75. Sellera FP, Fernandes MR, Ruiz R, Falleiros ACM, Rodrigues FP, Cerdeira L,
3580 Lincopan N (2018) Identification of KPC-2-producing *Escherichia coli* in a companion
3581 animal: a new challenge for veterinary clinicians. *Antimicrob Chemother* 73:2259–
3582 2261. <https://doi.org/10.1093/jac/dky173>
- 3583 76. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH (2016) Global Dissemination
3584 of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic
3585 Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol* 7:
3586 895. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00895>
- 3587 77. Vásquez-Ponce F, Dantas K, Becerra J, Melocco G, Esposito F, Cardoso B,
3588 Rodrigues L, Lima K, de Lima AV, Sellera FP, Mattos R, Trevisoli L, Vianello MA,
3589 Sincero T, Di Conza J, Vespero E, Gutkind G, Sampaio J, Lincopan N (2022) Detecting
3590 KPC-2 and NDM-1 Coexpression in *Klebsiella pneumoniae* Complex from Human and
3591 Animal Hosts in South America. *Microbiol Spectr* 10:e0115922.
3592 <https://doi.org/10.1128/spectrum.01159-22>

- 3593 78. Knecht CA, Allende NG, Álvarez VE, Prack McCormick B, Massó MG, Piekar M,
3594 Campos J, Fox B, Camicia G, Gambino AS, Leguina ACDV, Donis N, Fernández-
3595 Canigia L, Quiroga MP, Centrón D (2022) Novel insights related to the rise of KPC-
3596 producing *Enterobacter cloacae* complex strains within the nosocomial niche. Front
3597 Cell Infect Microbiol 12:951049. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.951049>
- 3598 79. Ishii J, Freitas J, Bahr Arias MV (2011) Resistance of bacteria isolated from dogs
3599 and cats at the Londrina Veterinary Hospital (2008-2009). Pesq Vet Bras 31:533-537.
3600 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000600013>
- 3601 80. Souza MM, Bordin JT, Pavan ACL, Rodrigues RGA, Sfaciotte RAP, Vignoto VKC,
3602 Ferrante M, Wosiacki SR (2020) Antimicrobial resistance evaluation of bacteria
3603 isolated from infections in small animals in the Umuarama region, Paraná. Pesq Vet
3604 Bras 40:804-813. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6420>
- 3605 81. Rocha FR, Pinto VPT, Barbosa FCB (2016) The Spread of CTX-M-Type Extended-
3606 Spectrum β -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. Microb Drug Resist 22:301–
3607 311. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0180>
- 3608 82. McGee L, Pletz MW, Fobiwe JP, Klugman KP (2015) Antibiotic Resistance of
3609 Pneumococci. In: Brown J, Hammerschmidt S, Orihuela C (1ed) *Streptococcus*
3610 *pneumoniae*. Molecular Mechanism of Host-Pathogen Interactions. 1Ed.; Academic
3611 Press, USA, pp. 21–40.
- 3612 83. Stegemann MR, Passmore CA, Sherington J, Lindeman CJ, Papp G, Weigel DJ,
3613 Skogerboe TL (2006) Antimicrobial activity and spectrum of cefovecin, a new
3614 extended- spectrum cephalosporin, against pathogens collected from dogs and cats in
3615 Europe and North America. Antimicrob Agents Chemother 50:2286–2292.
3616 <https://doi.org/10.1128/AAC.00077-06>
- 3617 84. Stegemann MR, Sherington J, Blanchflower S (2006) Pharmacokinetics and
3618 pharmacodynamics of cefovecin in dogs. J Vet Pharmacol Ther 29:501–511.
3619 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2006.00801.x>
- 3620 85. Waksman SA, Lechevalier HA (1949) Neomycin, a New Antibiotic Active against
3621 Streptomycin-Resistant Bacteria, including Tuberculosis Organisms. Science 109:
3622 305–307. <https://doi.org/10.1126/science.109.2830.305>
- 3623 86. Anderson REV, Boerlin P (2020) Carbapenemase-
3624 producing *Enterobacteriaceae* in animals and methodologies for their detection. Can J
3625 Vet Res 84:3–17. PMID: 31920216; PMCID: PMC6921994.
- 3626 87. Salgado-Caxito M, Benavides JA, Munita JM, Rivas L, García P, Listoni FJP,

- 3627 Moreno-Switt AI, Paes AC (2021) Risk factors associated with faecal carriage of
3628 extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* among dogs in Southeast
3629 Brazil. *Prev Vet Med* 190:105316. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105316>
- 3630 88. Sartori L, Sellera FP, Moura Q, Cardoso B, Fontana H, Côrtes LA, Cerdeira L,
3631 Lincopan N (2020) Genomic features of a polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae*
3632 ST491 isolate co-harboring bla_{CTX-M-8} and qnrE1 genes from a hospitalised cat in São
3633 Paulo, Brazil. *J Glob Antimicrob Resist* 21:186–187.
3634 <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.03.006>
- 3635 89. Sellera FP, Fuga B, Fontana H, Esposito F, Cardoso B, Konno S, Berl C,
3636 Cappellanes MH, Cortez M, Ikeda M, de Souza CM, Cerdeira L, Lincopan N (2021)
3637 Detection of IncN-pST15 one-health plasmid harbouring bla_{KPC-2} in a
3638 hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated from an infected dog,
3639 Brazil. *Transbound Emerg Dis* 68:3083–3088. <https://doi.org/10.1111/tbed.14006>
- 3640 90. Wanapat M, Cherdthong A, Phesatcha K, Kang S (2015) Dietary sources and their
3641 effects on animal production and environmental sustainability. *Animal nutrition* 1:96–
3642 103. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.07.004>
- 3643 91. Trott D (2013) β -lactam resistance in gram-negative pathogens isolated from
3644 animals. *Curr Pharm Des* 19:239–249. PMID: 22894614.
- 3645 92. Hassani A, Khan G (2020) Human-Animal Interaction and the Emergence of SARS-
3646 CoV-2. *JMIR Public Health Surveill* 6:e22117. <https://doi.org/10.2196/22117>
- 3647 93. Manyi-Loh C, Mamphweli S, Meyer E, Okoh A (2018) Antibiotic Use in Agriculture
3648 and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health
3649 Implications. *Molecules* 23:795. <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>
- 3650 94. EMA - European Medicines Agency (2016) Guideline for the demonstration of
3651 efficacy for veterinary medicinal products containing antimicrobial substances.
3652 [https://www.ema.europa.eu/en/demonstration-efficacy-veterinary-medicinal-products-](https://www.ema.europa.eu/en/demonstration-efficacy-veterinary-medicinal-products-containing-antimicrobial-substances-scientific-guideline)
3653 [containing-antimicrobial-substances-scientific-guideline](https://www.ema.europa.eu/en/demonstration-efficacy-veterinary-medicinal-products-containing-antimicrobial-substances-scientific-guideline). Accessed 02 May 2024
- 3654 95. Palma E, Tilocca B, Roncada P (2020) Antimicrobial Resistance in Veterinary
3655 Medicine: An Overview. *Int J Mol Sci* 21:1914. <https://doi.org/10.3390/ijms21061914>
- 3656 96. Saha M, Sarkar A (2021) Review on Multiple Facets of Drug Resistance: A Rising
3657 Challenge in the 21st Century. *J Xenobiot* 11:197–214.
3658 <https://doi.org/10.3390/jox11040013>
- 3659 97. Santos L, Ramos F (2018) Antimicrobial resistance in aquaculture: Current
3660 knowledge and alternatives to tackle the problem. *Int J Antimicrob Agents* 52:135–143.

- 3661 <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010>
- 3662 98. Sindan - National Union of the Animal Health Products Industry (2020)
- 3663 <https://sistemas.sindan.org.br/cpvs/pesquisar.aspx>. Accessed 06 June 2022.
- 3664 99. WHO (2024) List of Medically Important Antimicrobials.
- 3665 [https://www.who.int/news/item/08-02-2024-who-medically-important-antimicrobial-list-](https://www.who.int/news/item/08-02-2024-who-medically-important-antimicrobial-list-2024)
- 3666 [2024](https://www.who.int/news/item/08-02-2024-who-medically-important-antimicrobial-list-2024). Accessed 12 February 2024.

Table 1 – Antimicrobial agents used in the antibiogram

Class	Agent (Acronym, concentration/disk)
Aminoglycosides	Amikacin (AK, 30µg)
	Gentamicin (GEN, 10µg)
	Neomycin (NEO, 30µg)
	Tobramycin (TOB, 10µg)
Phenicols	Chloramphenicol (C, 30µg)
	Florfenicol (FLF, 30µg)
Beta-lactams	
Carbapenems	Imipenem (IPM, 10µg) Meropenem (MRP, 10µg)
1st generation Cephalosporins	Cephalexin (CFE, 30µg) Cephalothin (CFL, 30µg) Cefazolin (CFZ, 30µg)
2nd generation Cephalosporins	Cefuroxime (CRX, 30µg) Cefoxitin (CFO, 30µg)
3rd generation Cephalosporins	Cefovecin (CVN, 30µg) Ceftiofur (CTF, 30µg) Ceftriaxone (CRO, 30µg)
4th generation Cephalosporin	Cefepime (CPM, 30µg)
Monobactam	Aztreonam (ATM, 30µg)
Penicillins	Amoxicillin (AMO, 10µg)
	Amoxicillin + Clavulanic Acid (AMC, 30µg [20/10])
	Ampicillin (AMP, 10µg)
	Penicillin (PEN, 10µg)
Macrolides	Azithromycin (AZI, 15µg)
	Rifampicin (RIF, 5µg)
Quinolones	Ciprofloxacin (CIP, 5µg)
	Enrofloxacin (ENO, 5µg)
	Levofloxacin (LVX, 5µg)
	Norfloxacin (NOR, 5µg)
Sulfonamides	Sulfamethoxazole + Trimethoprim (SXT 23.75µg + 1.25µg)
Tetracyclines	Doxycycline (DOX, 30µg)
	Tetracycline (TET, 30µg)

Table 2 – Target genes, nucleotide sequence of primers used in polymerase chain reactions (PCR) and multiplex polymerase chain reaction (mPCR) expected amplicon size.

Group	Target Gene	Nucleotide sequence (5' - 3')	Primers [concentration]	Amplicon size	Reference
ESBL*	CTX-M-1	Fw ^a : AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC Rv ^b : AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT	CTX-M-1F and 1R [20pmol]	415	Woodford et al. [34]
	CTX-M-2	Fw: CGA CGC TAC CCC TGC TAT T Rv: CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG	CTX-M-2F and 2R [20pmol]	552	
	CTX-M-8	Fw: TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC Rv: AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	CTX-M-8F and 8R [20pmol]	666	
	CTX-M-9	Fw: CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG Rv: TT GGA AAG CGT TCA TCA CC	CTX-M-9F and 9R [20pmol]	205	
	CTX-M-25	Fw: GCA CGA TGA CAT TCG GG Rv: AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	CTX-M-25F and 25 R [20pmol]	327	
AmpC[#]	MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 to CMY-11 LAT-1 to LAT-4, CMY-2 to CMY-7, BIL-1	Fw: GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT Rv: CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	MOXMF, MOXMR [20pmol]	520	Perez; Hanson [33]
	DHA-1, DHA-2	Fw: AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T Rv: CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	DHAMF, DHAMR [20pmol]	405	
	ACC	Fw: AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA Rv: TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	ACCMF, ACCMR [20pmol]	346	
	MIR-1T ACT-1	Fw: TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG Rv: CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	EBCMF; ABCMR [20pmol]	302	
	FOX-1 to FOX-5b	Fw: AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G Rv: CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	FOXMF, FOXMR [20pmol]	190	
Metallo-beta-lactamase	IMP ¹	Fw: GAATAG(A/G)(A/G)TGGCTTAA(C/T)TCTC Rv: CCAAAC(C/T)ACTA(G/C)GTTATC	IMPgen-F1 and R1 [100pmol]	188	Mendes et al. [35]
	GIM ²	Fw: TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC Rv: CGGAACGACCATTTGAATGG	SIM-F1 and R1 [10pmol]	569	
	SIM ³	Fw: GTACAAGGGATTTCGGCATCG Rv: TGGCCTGTCCCATGTGAG	GIM-F1 and R1 [10pmol]	72	

Carbape nemases	SPM ⁴	Fw: CTAATCGAGAGCCCTGCTTG Rv: CCTTTCCGCGACCTTGATC	SPM-F1 and R1 [10pmol]	798	
	VIM ⁵	Fw: GTTTGGTCGCATATCGCAAC Rv: AATGCGCAGCACCAGGATAG	VIMgen-F2 and R2 [10pmol]	382	
	OXA-48 ⁶	Fw: GCGTGGTTAAGGATGAACAC Rv: CATCAAGTTCAACCCAACCG	NDM-F and -R [20pmol]	438	Doyle et al. [36]
	NDM ⁷	Fw: GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC Rv: GGTCGCGAAGCTGAGCACCGCAT	OXA-48-F and 48-R [20pmol]	82	
	KPC ⁸	Fw: TGTCACTGTATCGCCGTC Rv: CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	5; 10 [10pmol]	1011	Yigit ey al. [37]

Table 3 – Mix used in polymerase chain reaction (PCR) and multiplex polymerase chain reaction (mPCR) amplification protocols.

Beta-lactamase	SuperMix	Mix	Primers FW ¹	Primers RV ²	Ultrapure water	DNA sample extracted	Final reaction volume
<i>bla</i> CTX-M *	A	6,25 µl	0,5 µl	0,5 µl	3,75 µl	1,5 µl	12,5 µl
<i>AmpC</i> ³	B	21 µl	1 µl	1 µl	-	2 µl	25 µl
<i>bla</i> IMP							
<i>bla</i> GIM							
<i>bla</i> SIM	A	10 µl	0,5 µl	0,5 µl	-	1 µl	12 µl
<i>bla</i> VIM							
<i>bla</i> SPM*							
<i>bla</i> OXA * e	C	6 µl	0,25 µl	0,25 µl	4 µl	1 µl	12 µl
<i>bla</i> NDM *			each	each			
<i>bla</i> KPC	A	45 µl	1 µl	1 µl	-	3 µl	50 µl

¹ **FW**: primer forward

² **RV**: primer reverse

³ **AmpC**: MOX1, MOX2, CMY-1, CMY-8 to CMY-11, LAT1 to LAT-4, CMY-2 to CMY-7, BIL-1, DHA-1, DHA-2, ACC, MIR-1T ACT-, FOX1 to FOX-5b.

Supermix A. Platinum PCR SuperMix. Invitrogen, Thermofisher, Massachusetts, EUA. Platinum PCR SuperMix [U 22U Taq DNA, 22mM Tris-HCL, 55mM KCL, 1.65mM MgCl₂, 220µM dGTP, 220µM dATP, 220µM Dttp, 220µMCTP e estabilizantes]. **Supermix B**. Promega, Wiscosin, EUA. **Supermix C**. PCR SuperMix NZY. NZYTech, Lisbon, Portugal. NZYTech Taq II 2x Green Supermix [0.2U/µL Taq DNA, 2.5mM MgCl₂].

* Adapted final volume.

Table 4 – Polymerase chain reaction (PCR) and multiplex polymerase chain reaction (mPCR) amplification protocols

Beta-lactamase	Initial denaturation	Denaturation	Melting temperature	Extension Temperature	Final extension	Nº of cycles
<i>bla</i> CTX-M ¹	94°C 5min	94°C 25s	62°C 40s	72°C 50s	72°C 6min	30x
AmpC ²	94°C 3min	94°C 30s	61°C 30s*	72°C 1min	72°C 7min*	25x
<i>bla</i> IMP* & <i>bla</i> GIM*	94°C 5min	94°C 20s	53°C 45s	72°C 30s	72°C 6min	35x
<i>bla</i> SIM* & <i>bla</i> VIM*	94°C 5min	94°C 20s	55.5°C 45s*	72°C 30s	72°C 6min	35x
<i>bla</i> SPM*	94°C 5min	94°C 20s	56.5°C 45s*	72°C 30s	72°C 6min	35x
<i>bla</i> OXA ³ & <i>bla</i> NDM	94°C 5min	94°C 45s	63°C 45s	72°C 1min	72°C 8min	35x
<i>bla</i> KPC ⁴	94°C 5min	94°C 1min	58°C 30s	72°C 1:30min	72°C 10min	35x

¹mPCR performed for genes CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9 e CTX-M25

² mPCR performed for genes MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-2, CMY-3, CMY-4, CMY-5, CMY-6, CMY-7, CMY-8, CMY-11, LAT-1, LAT-2, LAT-3, LAT-4, BIL-1, DHA-1, DHA-2, ACC, MIR-1T, ACT-1, FOX-1, FOX-2, FOX-3, FOX-4 e FOX-5b

³mPCR performed for genes NDM e OXA-48

⁴Convencional PCR performed for KPC-1 e KPC-2

*Adapted by the author.

Table 5 – Resistance profile of isolates as suggested by Magiorakos et al. (2012)

ID	Species	Material	Isolate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Classification
BER 24	Feline	Urine	<i>Klebsiella</i> spp.	R	R	S	R	S	R	R	R	R*	R	R	R	R	MDR
BER 25	Canine	Urine	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 56	Equine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	MDR
BER 59	Equine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
BER 63	Equine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
BER 104	Canine	Bladder mucosa	<i>Klebsiella</i> spp.	R	R	S	R	S	R	R	R	R*	R	R	R	R	MDR
BER 107	Canine	Dermal wound	<i>Proteus</i> spp.	R	R	R	R*	R	R	S	R	R*	R	R	R	R*	XDR
BER 123	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 124	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	MDR
BER 129	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 161	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	R	MDR
BER 162	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	MDR
BER 163	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 169	Canine	Urine	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 172	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	MDR
BER 175	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 178	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 179	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 182	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 185	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	MDR
BER 188	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
BER 193	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 194	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 197	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 219	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 225	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 228	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	MDR

BER 229	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	MDR
BER 271	Canine	Blood	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
BER 274	Canine	Blood	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	MDR
BER 275	Feline	Dermal wound	<i>Klebsiella</i> spp.	R	S	S	R	S	R	R	R	R*	R	R	R	R	MDR
BER 276	Canine	Urine	<i>Proteus</i> spp.	R	R	R	R*	R	R	S	R	R*	R	R	R	R*	XDR
BER 279	Canine	Urine	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 282	Canine	Urine	<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 283	Canine	Urine	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
BER 284	Feline	Bile	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 296	Equine	Endometrium	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
BER 302	Canine	Urine	<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 304	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 305	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
BER 306	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	MDR
BER 307	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 308	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	R	MDR
BER 309	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R	MDR
BER 310	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
BER 311	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 312	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 313	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 314	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 315	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 316	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 317	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 318	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 319	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 320	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 321	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 322	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR

BER 391	Feline	Urine	<i>Klebsiella</i> spp.	R	R	R	R	S	R	R	R	R*	R	R	R	R	MDR
BER 393	Canine	Urine	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 398	Canine	Synovial membrane	<i>Escherichia coli</i>	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
BER 405	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	MDR
BER 442	Canine	Urine	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	MDR
BER 464	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S	R	MDR
BER 466	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	MDR
BER 468	Bovine	Feces	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	MDR
BER 497	Feline	Urine	<i>Klebsiella</i> spp.	R	R	R	R	R	R	R	R	R*	R	R	R	R	XDR
BER 623	Canine	Bladder mucosa	<i>Klebsiella aerogenes</i>	S	S	S	R	R	R	S	R	R*	R	R	R	R	MDR
BER 627	Canine	Urine	<i>Klebsiella aerogenes</i>	R	R	S	R	R	R	R	R	R*	R	R	R	R	XDR
M9	Bovine	Milk	<i>Klebsiella</i> spp.	R	S	S	R	S	R	R	R	R*	R	R	R	R	MDR
M35	Bovine	Milk	<i>Klebsiella</i> spp.	S	R	R	R	S	R	S	R	R*	R	R	R	R	MDR
BER 634	Canine	Urine	<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 641	Feline	Urine	<i>Klebsiella</i> spp.	R	R	S	R	S	R	R	R	R*	R	R	R	R	XDR
BER 644	Canine	Abdominal fluid	<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 645	Canine	Urine	<i>Klebsiella omithinolytica</i>	S	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	MDR
BER 646	Canine	Urine	<i>Klebsiella</i> spp.	R	S	S	R	S	R	R	R	R*	R	R	R	S	MDR
BER 649	Canine	Blood	<i>Klebsiella aerogenes</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R*	R	R	R	R	MDR
BER 650	Tilapia	Eye	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R*	R	R	R	R	MDR
BER 651	Canine	Dermal wound	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 655	Canine	Otologic secretion	<i>Proteus</i> spp.	R	R	S	R*	R	R	S	R	R*	R	R	R	R*	MDR
BER 660	Canine	Nasal secretion	<i>Klebsiella</i> spp.	S	S	S	R	S	R	S	R	R*	R	R	S	R	MDR
BER 663	Canine	Urine	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	MDR
BER 670	Feline	Urine	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 672	Feline	Urine	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
BER 678	Tilapia	Kidney	<i>Klebsiella</i> spp.	S	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	R	MDR
BER 681	Canine	Otologic secretion	<i>Klebsiella oxytoca</i>	S	S	S	R	S	R	R	R	R*	R	S	S	S	MDR
BER 695	Canine	Urine	<i>Klebsiella</i> spp.	R	S	S	R	S	R	R	R	R*	R	R	R	R	MDR
BER 696	Canine	Urine	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	MDR

BER 703	Tilapia	Spleen	<i>Klebsiella</i> spp.	R	R	R	R	S	S	S	R	R*	R	R	S	R	MDR
BER 704	Tilapia	Liver	<i>Klebsiella</i> spp.	S	S	S	R	S	R	S	R	R*	R	R	S	S	MDR
BER 705	Tilapia	Eye	<i>Klebsiella</i> spp.	S	R	S	S	S	S	S	R	R*	R	R	S	S	MDR
BER 706	Tilapia	Dermal wound	<i>Klebsiella</i> spp.	S	S	S	S	S	R	S	R	R*	R	R	S	R	MDR
BER 708	Tilapia	Spleen	<i>Escherichia coli</i>	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	XDR
BER 719	Canine	Nasal secretion	<i>Proteus</i> spp.	S	S	R	R*	S	R	S	R	R*	R	S	S	R*	MDR
BER 721	Canine	Urine	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 722	Canine	Urine	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 730	Canine	Urine	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 737	Canine	Dermal wound	<i>Klebsiella</i> spp.	R	S	S	R	S	R	R	R	R*	R	R	R	R	MDR
BER 738	Feline	Urine	<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MDR
BER 742	Canine	Dermal wound	<i>Klebsiella</i> spp.	R	R	S	R	R	R	S	R	R*	R	R	R	R	MDR
BER 743	Canine	Nasal secretion	<i>Klebsiella</i> spp.	R	R	S	R	R	R	R	R	R*	R	R	R	R	XDR

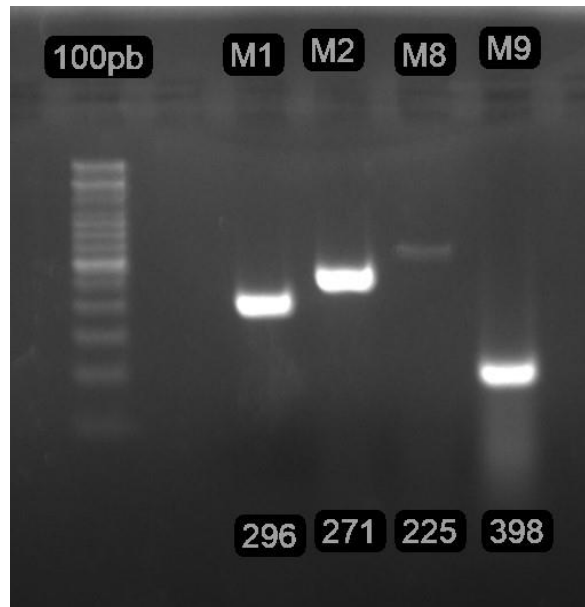
Classification of resistance (**R**) or sensitive (**S**) according to Magiorakos et al. (2012), a representative of the class conferred resistant characteristics and classification as multidrug resistant (MDR). Sensitivity to a representative of a maximum of two classes was considered extensively resistant (XDR).

R*: intrinsic resistance for at least one representative of the class. Intermediates represented as resistant. **(1)** Aminoglycosides; **(2)** Amphenicols; **(3)** Carbapenem; **(4)** Cephalosporin 1st + 2nd generation; **(5)** Cephamycin; **(6)** 3rd and 4th generation cephalosporin; **(7)** Monobactam; **(8)** Penicillins; **(9)** Ampicillin; **(10)** Macrolides; **(11)** Quinolones; **(12)** Sulfonamides; **(13)** Tetracyclines.

Table 6 – GenBank record sequence of sequenced species.

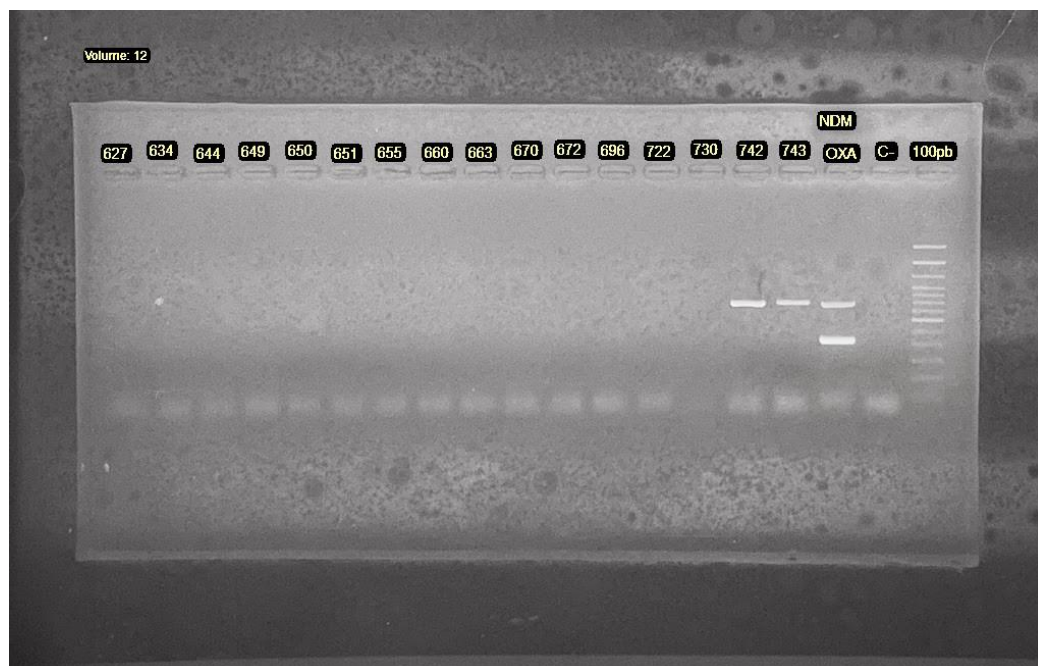
Gene	Specie (ID)	GenBank Accession Numbers
<i>bla</i> CTX-M-1	<i>E. coli</i> 296	PP693902
<i>bla</i> CTX-M-2	<i>E. coli</i> 271	PP693903
<i>bla</i> CTX-M-8	<i>E. coli</i> 225	PP693904
<i>bla</i> CTX-M-9	<i>E. coli</i> 389	PP693905
<i>bla</i> DHA	<i>E. coli</i> 644	PP693906
<i>bla</i> CMY	<i>Proteus</i> spp. 276	PP693908
<i>bla</i> KPC	<i>Klebsiella</i> spp. 497	PP693907
<i>bla</i> NDM	<i>Klebsiella</i> spp. 742	PP934843

Figure 1 – Gel electrophoresis of PCR products demonstrating positivity for the *bla*CTX-M group



Samples 296 (containing M1), 271 (M2), 225 (M8) and 398 (M9).

Figure 2 – Gel electrophoresis of PCR products demonstrating positivity for New Delli beta-lactamase and OXA beta-lactamase carbapenemases



mPCR to New-Delli metallo-beta-lactamase (NDM) and OXA-metallo-beta-lactamase (OXA). Samples 742 and 743 positive to presence of NDM.

Figure 3 – Gel electrophoresis of PCR products demonstrating positivity for KPC beta-lactamase



Sample 497 positive to KPC enzyme

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A crise da seleção de bactérias multirresistentes é fomentada pelo uso inadequado de antimicrobianos e configura um desafio multifacetado que exige abordagem colaborativa entre medicina humana e animal para mitigar impactos negativos na saúde única.

Ao destacar a presença de *Enterobacteriaceae* multirresistentes e extensivamente resistentes, carreadoras de ESBL e carbapenemases nas mais diversas amostras de caninos, felinos, equinos, bovinos e peixes no Brasil se pretende enfatizar a complexidade e as questões críticas resultantes da utilização de antibióticos em animais, que resultam diretamente em um ambiente pressionado para seleção de microrganismos com capacidade de resistência. O destaque de altas taxas de resistência as subclasses de beta-lactâmicos, os antibióticos mais utilizados na terapêutica humana e veterinária, alerta o papel utilitário do médico veterinário, sendo chamado a avaliar cuidadosamente as consequências das suas decisões de escolha de tratamento.

Neste contexto, se evidencia a necessidade de vigilância contínua do estado de resistência aos antibacterianos com vista a estratégias eficazes de tratamento e mitigação contra esta crise iminente. À medida que evidências científicas continuam a destacar os riscos associados ao uso indiscriminado de antibacterianos, é imperativo que todos os agentes envolvidos nos âmbitos da saúde única, com destaque para produtores de animais, indústrias, legisladores, organizações de saúde pública e a sociedade em geral, reconheçam a urgência de implementar estratégias eficazes de controle e prevenção.

O conhecimento do *status* sanitário local e nacional, objetivo deste trabalho, permite o desenvolvimento e implementação de ações de controle e profilaxia adequadas a realidade. Além disso, promover o estabelecimento de regulamentações mais rigorosas e o incentivo à pesquisa de alternativas terapêuticas são atitudes providenciais para o combate a esse desafio eminente.