

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima

**PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS ISOLADOS  
DAS MÃOS DE TRABALHADORES DE FAZENDAS DE SUINOCULTURA NO  
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Porto Alegre

2020

Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima

**PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS ISOLADOS  
DAS MÃOS DE TRABALHADORES DE FAZENDAS DE SUINOCULTURA NO  
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia Clínica.

Orientador: Profa. Dra. Andreza Francisco Martins

Porto Alegre

2020

### CIP - Catalogação na Publicação

Lima, Amanda Muliterno Domingues Lourenço de  
Perfil de susceptibilidade de bacilos  
Gram-negativos isolados das mãos de trabalhadores de  
fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do  
sul, Brasil / Amanda Muliterno Domingues Lourenço de  
Lima. -- 2020.  
58 f.  
Orientadora: Andreza Francisco Martins.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Ciências Básicas da Saúde, Microbiologia Clínica,  
Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Resistência a antimicrobianos. 2. Bacilos  
Gram-negativos. 3. Produção animal. 4. Suínos. 5.  
Trabalhadores rurais. I. Martins, Andreza Francisco,  
orient. II. Título.

## RESUMO

O mercado de produção animal brasileiro é considerado um dos mais importantes do mundo, sendo um dos principais produtores e exportadores de carne suína. O estado do Rio Grande do Sul se destaca tanto no mercado nacional quanto no internacional. A utilização extensiva de antibióticos pela produção animal favorece a pressão de seleção e contribui para o aumento da disseminação de bactérias e genes de resistência. Responsável por grandes perdas econômicas na indústria suína mundial, bacilos Gram-negativos (BGNs) representam algumas das principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva brasileira. A resistência antimicrobiana (AMR) em BGNs é considerada um desafio devido aos mecanismos altamente especializados por meio do qual genes de resistência podem ser disseminados. Embora os mecanismos de transferência de determinantes de resistência de animais para humanos não tenham sido elucidados adequadamente, evidências consideráveis apontam para a transferência de resistência antimicrobiana entre animais de produção e trabalhadores agrícolas. O objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar o perfil de susceptibilidade de bacilos Gram-negativos isolados das mãos dos trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram coletados swabs das mãos de 58 trabalhadores de 37 granjas de suínos, entre Março e Setembro de 2018. Os swabs foram inoculados meio Stuart para o transporte das amostras ao laboratório. As amostras foram inoculadas em caldo BHI, semeadas em ágar MacConkey e submetidas a testes bioquímicos de citrato, TSI e MIO. Os isolados bacterianos foram identificados pelo MALDI-TOF e submetidos ao teste de suscetibilidade por disco difusão além da triagem de Enterobacteriaceae produtoras de ESBL pelo método de sinergismo de disco duplo (TSDD). Os antimicrobianos testados foram: AK30, amicacina; AMC30, amoxicilina-ácido clavulânico; APS20, ampicilina-sulbactam; ATM30, aztreonam; FEP30, cefepima; CTX30, cefotaxima; CAZ30, ceftazidima; EFT30, ceftiofur; CRO30, ceftriaxona; CIP5, ciprofloxacina; ENR5, enrofloxacina; CN10, gentamicina; IMP10, imipenem; LEV5, levofloxacina; MEM10, meropenem; PIT110, piperaciclina-tazobactam; SXT25, sulfametoxazol-trimetoprim; TET30, tetraciclina; TIC85, ticarcilina-clavulanato; e TOB10, tobramicina. Dos 67 isolados selecionados no estudo, 65 (97%) foram identificados por MALDI-TOF com escore acima de 1,7; sendo 45(69,2%) BGN fermentadores pertencentes a família Enterobacteriaceae e 20 (30,8%) BGN não fermentadores, que correspondem a 14 (21,5%) *Acinetobacter* spp., 5(7,7%) *Pseudomonas* spp. e 1 (1,5%) *Stenotrophomonas maltophilia*. A análise dos resultados demonstrou que 1 (1,5%) BGN não fermentador foi resistente e 13 (20%) foram intermediários, enquanto 14 (21,5%) BGN fermentadores foram resistentes e cinco (7,7%) intermediários a pelo menos um antimicrobiano testado, sendo dois (3,1%) isolados identificados como *Pantoea agglomerans* com perfil de multirresistência e produtores de ESBL. Através destes resultados podemos observar que, apesar de transitória, a microbiota das mãos dos trabalhadores carrega bactérias multirresistentes que estão presentes no ambiente da fazenda. Assim, reforça-se a necessidade de formular e implementar medidas de controle e vigilância que busquem mitigar a propagação potencial de genes de resistência entre homens, animais e ambiente.

Palavras-chave: Resistência a antimicrobianos. Bacilos Gram-negativos. Produção animal. Suínos. Trabalhadores rurais.

## ABSTRACT

The Brazilian animal production market is considered one of the most important in the world, being one of the biggest producers and exporters of pork. The state of Rio Grande do Sul stands out in both the national and international markets. The extensive use of antibiotics in animal production favors selection pressure and contributes to the increase in the spread of bacteria and resistance genes. Responsible for significant economic losses in the global swine industry, Gram-negative bacilli (BGNs) represent some of the leading health threats endemic to the Brazilian productive sector. Antimicrobial resistance (AMR) in BGNs is considered a challenge due to the highly specialized mechanisms through which could disseminate resistance genes. Although the mechanisms for transferring resistance determinants from animals to humans have not been yet fully elucidated, considerable evidence points to the transfer of antimicrobial resistance between farm animals and workers. This study aimed to identify and evaluate the susceptibility profile of Gram-negative bacilli isolated from the hands of pig farming workers in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Swabs were collected from the hands of 58 workers from 37 pig farms between March and September 2018. Swabs were inoculated through Stuart to transport samples to the laboratory. Samples were inoculated in BHI broth, sown on MacConkey agar, and subjected to biochemical tests of citrate, TSI, and MIO. The bacterial isolates were identified by MALDI-TOF and subjected to disk diffusion susceptibility testing in addition to screening for ESBL-producing Enterobacteriaceae by the double disk synergism method (TSDD). The tested antimicrobials were: AK30, amikacin; AMC30, amoxicillin-clavulanic acid; APS20, ampicillin-sulbactam; ATM30, aztreonam; FEP30, cefepime; CTX30, cefotaxime; CAZ30, ceftazidime; EFT30, ceftiofur; CRO30, ceftriaxone; CIP5, ciprofloxacin; ENR5, enrofloxacin; CN10, gentamycin; IMP10, imipenem; LEV5, levofloxacin; MEM10, meropenem; PIT110, piperacillin-tazobactam; SXT25, trimethoprim-sulfamethoxazole; TET30, tetracycline; TIC85, ticarcillin-clavulanate; and TOB10, tobramycin. Of the 67 isolates selected in the study, 65 (97%) were identified by MALDI-TOF with a score above 1.7; 45 (69.2%) fermenting BGN belonging to the Enterobacteriaceae family and 20 (30.8%) non-fermenting BGN, which correspond to 14 (21.5%) *Acinetobacter* spp., 5 (7.7%) *Pseudomonas* spp. and one (1.5%) *Stenotrophomonas maltophilia*. Analysis of the results showed that 1 (1.5%) non-fermenting BGN was resistant, and 13 (20%) were intermediate, while 14 (21.5%) BGN fermenters were resistant and five (7.7%) intermediate at least one antimicrobial tested, with two (3.1%) isolates identified as *Pantoea agglomerans* with a multi-resistance profile and ESBL producers. Through these results, we can see that, although transient, the microbiota in the workers' hands carries multiresistant bacteria that are present in the farm environment. Therefore, the need to formulate and implement control and surveillance measures that seek to mitigate the potential spread of resistance genes among humans, animals, and the environment is reinforced.

Keywords: Antimicrobial resistance. Gram-negative bacilli. Animal production. Pigs. Rural workers.

## SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>6</b>  |
| 1.1      | PRODUÇÃO DE SUÍNOS NO BRASIL .....   | 6         |
| 1.2      | PROGRAMAS BRASILEIROS DE ATENÇÃO A RESISTÊNCIA A<br>ANTIMICROBIANOS NA PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA .....   | 6         |
| 1.3      | RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS .....  | 8         |
| 1.4      | RESISTÊNCIA NA PRODUÇÃO ANIMAL.....  | 9         |
| 1.5      | RESISTÊNCIA DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS ASSOCIADA A<br>PLASMÍDEOS .....  | 11        |
| 1.6      | DISSEMINAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES PROVENIENTES DA<br>PRODUÇÃO RURAL.....   | 15        |
| 1.7      | OBJETIVOS.....   | 16        |
| 1.7.1    | Objetivo Geral.....  | 16        |
| 1.7.2    | Objetivos específicos .....  | 17        |
| <b>2</b> | <b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>3</b> | <b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....</b>  | <b>33</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>34</b> |
|          | <b>APÊNDICE A – TABELA DE IDENTIFICAÇÃO DOS BACILOS GRAM-<br/>NEGATIVOS ISOLADOS DAS MÃOS DOS TRABALHADORES DE GRANJAS DE<br/>SUINOCULTURA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.....</b>                 | <b>39</b> |
|          | <b>APÊNDICE B – TABELA DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DOS BACILOS<br/>GRAM-NEGATIVOS ISOLADOS DAS MÃOS DOS TRABALHADORES DE<br/>GRANJAS DE SUINOCULTURA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL<br/>.....</b> | <b>41</b> |
|          | <b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA FRONTIERS IN<br/>MICROBIOLOGY .....</b>   | <b>43</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PRODUÇÃO DE SUÍNOS NO BRASIL

A carne suína é a fonte de proteína animal mais consumida em todo o mundo (1). A cadeia produtiva da suinocultura brasileira está voltada para a qualidade da carne e organizada de forma que a produção seja o suficiente para suprir o mercado interno e ainda seja destinado à exportação (1). De acordo com dados do relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) (2), o mercado de produção animal brasileiro é considerado um dos mais importantes do mundo, sendo um dos principais produtores e exportadores de carne suína. A produção brasileira de suínos ocupa a quarta posição depois da China, União Europeia e Estados Unidos (2,3). Em 2019, foram produzidas 3,983 milhões de toneladas, com um aumento de 0,22% de aumento na produção nacional em relação ao ano anterior (3). Um total de 750 mil toneladas foram exportadas, com um aumento de 16% em relação ao ano de 2018, fazendo do Brasil o quarto maior exportador mundial (3). Três estados da região sul do país detêm 80,3% das exportações brasileiras, sendo o Rio Grande do Sul o segundo maior exportador de carne suína brasileira depois do estado de Santa Catarina (2). O destino da produção brasileira de carne suína atende a 84% do mercado interno, com um consumo de 15,3kg de carne per capita, sendo o sexto lugar em consumo de carne suína no mundo (2,3). As adversidades causadas pelo COVID-19 e as interrupções na economia e no serviço de alimentação em 2020 acarretaram um decréscimo de 2% na produção de suínos brasileira devido à redução de expectativas de abate (4). Entretanto, o aumento da demanda mundial durante os cinco primeiros meses de 2020 superaram as expectativas resultando no aumento da projeção de importação pelo mercado externo (4). Esse aumento da demanda por produtos pecuários de alta qualidade pelo mercado internacional exige da produção brasileira a implementação de programas para reduzir a utilização de antimicrobianos e o desenvolvimento de estratégias para otimizar a produção e promover a manutenção do bem-estar e saúde animal. Como o consumo de antimicrobianos em animais produtores de alimentos contribui para o problema, são importantes políticas que restrinjam o uso agrícola inadequado ou desnecessário de drogas antimicrobianas.

## 1.2 PROGRAMAS BRASILEIROS DE ATENÇÃO A RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS NA PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), no combate a ameaça que representa a resistência a antimicrobianos, intensificaram ações conjuntas por meio de um plano de ação global (5). Em âmbito nacional, sob a coordenação do Ministério da Saúde, foi elaborado o Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos do Brasil (PAN-BR) em consonância com os objetivos definidos pelo Plano de Ação Global sobre Resistência aos Antimicrobianos. O objetivo geral dos planos de ação é garantir que se mantenha a capacidade de tratar e prevenir doenças infecciosas com medicamentos seguros e eficazes, que sejam de qualidade assegurada e que sejam utilizados de forma responsável e acessível a todos que deles necessitem (6).

Como parte do Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (PAN-BR), o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da Agropecuária, o PAN-BR AGRO, foi elaborado pela Comissão sobre Prevenção da Resistência aos Antimicrobianos em Animais (CPRA), no âmbito da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA/MAPA), em conjunto com a Secretaria de Mobilidade do Produtor Rural e Cooperativismo (SMC/MAPA) (7). O PAN-BR AGRO foi elaborado para ser executado em cinco anos, de 2018 a 2022. Sua operacionalização certamente irá ratificar a vocação do Brasil como país indispensável do núcleo estratégico da segurança alimentar mundial, pela produção de produtos sustentáveis, inócuos e competitivos internacionalmente (8).

Para garantir a sustentabilidade do Plano e a execução das atividades previstas, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa Nº 41, publicada no Diário Oficial em 23 de Outubro de 2017, instituiu o Programa Nacional de Prevenção e Controle de Resistência a Antimicrobianos na Agropecuária (AgroPrevine) (7). O AgroPrevine visa o fortalecimento de ações para prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos na agropecuária, considerando o conceito de Saúde Única, que estabelece a interdependência entre a saúde humana, animal e ambiental, utilizando como ferramentas educação sanitária, vigilância e defesa agropecuária (9).

No contexto da suinocultura, os trabalhos da CBPA são desenvolvidos com objetivo de elevar o grau de bem-estar dos suínos, especialmente com a adoção de novas práticas de alojamento e enriquecimento ambiental, assim como combater a resistência aos antimicrobianos (10).

### 1.3 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos representam uma das grandes revoluções da medicina humana (11). A descoberta da penicilina em 1928 e o seu uso clínico anos mais tarde promoveram uma mudança no curso da medicina sem precedentes (12). Com os avanços da microbiologia, biologia molecular e técnicas analíticas, numerosos compostos antibacterianos puderam ser identificados, purificados ou mesmo sintetizados para uso humano (13). Desde então, os antimicrobianos têm sido extensivamente utilizados, desde o tratamento de infecções bacterianas pela medicina humana e veterinária, até o uso profilático e subterapêutico na prevenção de possíveis infecções e aumento da eficiência alimentar na produção animal.

Como a maioria dos compostos antimicrobianos são moléculas produzidas naturalmente por microrganismos, eles acabaram desenvolvendo mecanismos para superar sua ação e sobreviver (14). Por meio do processo de seleção darwiniana, os microrganismos confrontados com a pressão da seleção antimicrobiana aumentam sua aptidão adquirindo e expressando genes de resistência, e depois compartilham esses genes com outras bactérias (15). Os mecanismos de proteção que evoluíram incluem a alteração na permeabilidade (porinas principalmente), expressão ou hiperexpressão de bombas de efluxo, a produção de enzimas que destroem ou modificam o antimicrobiano, ou alterações no alvo de ligação do antimicrobiano (16). Essa resistência pode advir de mutações, ou da transferência horizontal de genes (HGT), que pode ocorrer através de três mecanismos principais: (i) conjugação (por meio do compartilhamento de plasmídeos que carregam genes de resistência), (ii) transdução (mediada por um bacteriófago) e (iii) transformação (pela incorporação de DNA nu, por exemplo, de genes originários de bactérias mortas) (14,17).

A resistência antimicrobiana a uma ampla variedade de fármacos já foi demonstrada em bactérias ambientais isoladas desde a era pré-antibiótica (18). Trabalhos recentes identificaram a presença de bactérias e genes de resistência em locais livres de outras fontes de exposição a antimicrobianos modernos: permafrost antigo, cavernas isoladas e em espécimes humanos preservados por centenas de anos (19). Os resultados desses estudos contribuíram para suportar evidências experimentais diretas de que a resistência a antimicrobianos é antiga e fazem parte da história evolutiva de um fenômeno ambiental natural (20). Entretanto, a utilização extensiva de antimicrobianos pela clínica médica e produção animal favoreceu a pressão de seleção e acabou contribuindo para o aumento da disseminação de bactérias e genes de resistência.

#### 1.4 RESISTÊNCIA NA PRODUÇÃO ANIMAL

A agência norte-americana Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento para animais em 1951 (21). Desde então, numerosos antimicrobianos pertencentes a diferentes classes, incluindo  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas, anfenicóis, macrolídeos, sulfonamidas, fluoroquinolonas, lincosamidas, polipeptídeos e polienos tem sido utilizados em animais produtores de alimentos ao redor do mundo (22). Ao longo dos anos, os antimicrobianos foram utilizados na criação e aquicultura de animais para promoção do crescimento, melhoria da eficiência alimentar, profilaxia e também no tratamento de doenças infecciosas (20). Na pecuária intensiva e aquicultura, por razões de praticidade e eficiência, os antimicrobianos são frequentemente administrados por meio de ração ou água a grupos inteiros de animais (por exemplo, porcos, frangos), seja para profilaxia (para animais saudáveis em risco de infecção) ou metafilaxia (para animais saudáveis no mesmo grupo dos animais doentes) (18).

O papel dos antimicrobianos na promoção de crescimento e melhoria da eficiência alimentar animal foi embasado em estudos que avaliaram a taxa de conversão alimentar (FCR), crescimento animal e desempenho reprodutivo (22). Os estudos indicaram que a utilização de antimicrobianos em suínos por via oral promovem: (i) o aumento da digestibilidade da dieta e melhoraram a eficiência de utilização da ração; (ii) o aumento do ganho de peso; (iii) a melhora na taxa de concepção, taxa de parto, secreção de leite, eficiência produtiva da porca e taxa de nascidos vivos do leitão; e (iv) a melhora da qualidade da carcaça, diminuindo a espessura da gordura e aumentando a carne magra de animais produtores de alimentos (22). Entretanto, o uso de antimicrobianos para promoção do crescimento é altamente controverso porque, em vez de tratar animais doentes, eles são administrados a animais saudáveis, e são usados muitas vezes para compensar a falta de higiene e habitação ou como substituto para o manejo adequado da saúde animal (18).

Além disso, a administração de antimicrobianos como promotores de crescimento são contribuintes importantes para a resistência antimicrobiana porque são administrados a grupos inteiros de animais, geralmente por períodos prolongados de tempo e muitas vezes em doses subterapêuticas; condições que favorecem a seleção e disseminação de bactérias resistentes dentro e entre grupos de animais, bem como para humanos por meio de alimentos ou outras vias ambientais (15). O uso amplo e crescente de antimicrobianos na pecuária, uma consequência da demanda global por proteína animal, tem sido uma preocupação considerável

à luz da ameaça de resistência antimicrobiana (23). Além das consequências potencialmente graves para a saúde pública, a dependência de antimicrobianos para atender à demanda por proteína animal é uma provável ameaça à sustentabilidade da indústria pecuária e, portanto, ao sustento dos agricultores em todo o mundo (24).

A indústria suína experimentou um crescimento notável nos últimos 20 anos. Além de estar atrelada ao aumento da demanda, essa tendência também está relacionada à industrialização de processos, criação em massa e aumento da eficiência dos frigoríficos, que têm reduzido os custos de produção (25). Por isso, o aumento da capacidade das fazendas e matadouros tem concentrado um grande número de animais em espaços confinados, dificultando o controle de patógenos bacterianos e virais (25). Dessa forma, houve um aumento da utilização de antimicrobianos na suinocultura buscando a saúde animal e eficiência alimentar do plantel com propósito do aumento da produção.

Globalmente, 73% de todos os antimicrobianos vendidos na Terra são usados em animais criados para alimentação (24). De 2000 a 2018, um aumento da proporção da resistência a antimicrobianos foi observada na produção de aves, suínos e bovinos (24). Dois dos maiores produtores mundiais de suínos, a China e o Brasil, estão entre os maiores consumidores de antimicrobianos da atualidade (26). Ainda, de acordo com a distribuição global de AMR, a costa sul do Brasil tem sido considerada como uma das regiões críticas de resistência, sendo o Rio Grande do Sul um *hotspot* emergente (24).

Responsável por grandes perdas econômicas na indústria suína mundial, a diarreia pós-desmame é uma das principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos brasileira (27,28). Causada principalmente pela *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), leva a aproximadamente 50% da mortalidade dos leitões (27). Mesmo que algumas das abordagens preventivas para colibacilose neonatal e pós-desmame tenham mostrado alguma promessa e eficácia, os antibióticos ainda são frequentemente usados para tratar a colibacilose entérica, administrados pelas vias parenteral e oral (29). Na indústria suína, a maioria das cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênica são resistentes a tetraciclinas, aminoglicosídeos, trimetoprim-sulfonamidas e ampicilina, além de também ter sido relatado a emergência de resistência a fluoroquinolonas e colistina (25).

Outra bactéria Gram-negativa, a *Salmonella choleraesuis* é capaz de causar doença clínica em suínos, sendo pouco relatada em rebanhos brasileiros (30). Entretanto, a presença de outros sorovares são uma preocupação para a segurança alimentar e podem ser importantes fontes de contaminação para os produtos finais (28,30). A *Salmonella typhimurium*, que não

causa nenhum tipo de doença clínica em suínos, é a segunda mais importante nas infecções alimentares em humanos (31). As resistências mais comuns relatadas ao longo dos anos nos diferentes sorovares de salmonela foram à tetraciclina, estreptomicina, sulfonamida-trimetoprima e ampicilina (32). A principal preocupação em relação a transferência de resistência dos diferentes tipos de sorovares através da cadeia alimentar está associado a infecções humanas por salmonela resistente a drogas mais críticas como as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (ceftiofur e cefquinoma, respectivamente), pois estas selecionam para resistência às cefalosporinas humanas críticas (32). Não somente *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. estão envolvidas na disseminação de genes de resistência, mas também outras espécies que raramente são consideradas importantes para a saúde animal, como a *Klebsiella* spp., e também espécies ambientais, como *Acinetobacter* spp. (32), além de outras espécies de bacilos Gram-negativos de importância para a clínica humana que estão envolvidas na disseminação de genes de resistência através da cadeia de produção alimentar.

## 1.5 RESISTÊNCIA DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS ASSOCIADA A PLASMÍDEOS

Com a crescente consciência global da necessidade de novos antibióticos, em 2016 a OMS criou uma lista de prioridades de bactérias resistentes a antibióticos para direcionar a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos novos e eficazes (33). De acordo com a lista, bactérias multirresistentes associadas com infecções agudas, como, por exemplo, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e Enterobacteriaceae resistentes a carbapenêmicos, são classificadas como patógenos de prioridade crítica para o desenvolvimento de novos antibióticos (34). Isso porque o aumento da incidência de infecções Gram-negativas resistentes a antibióticos tornou-se o problema mais urgente na resistência bacteriana (35).

Bactérias Gram-negativas normalmente colonizam o trato gastrointestinal de mamíferos e são conhecidas por causar infecções oportunistas graves em humanos e animais. A resistência antimicrobiana (AMR) em bactérias Gram-negativas é considerada um desafio devido a plasticidade genética destes microrganismos, além de possuírem mecanismos altamente eficientes por meio dos quais genes de resistência podem ser disseminados entre as bactérias patogênicas e comensais da mesma espécie ou de espécies diferentes. Essas características únicas de bactérias Gram-negativas resultaram na evolução de cepas que demonstram resistência a várias classes de antimicrobianos (36). O uso indiscriminado de antimicrobianos em humanos e animais, juntamente com o aumento da conectividade global, facilitou a

transmissão de infecções Gram-negativas que abrigavam  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (35).

Ao longo do tempo, o aumento da utilização de antimicrobianos na produção animal resultou no aumento da pressão de seleção resultando em numerosos mecanismos de resistência a antimicrobianos associados a bacilos Gram-negativos. Na família Enterobacteriaceae (por exemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter*), as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs) medeiam a resistência às cefalosporinas de primeira a quarta geração (35).

De acordo com a classificação de Ambler, as  $\beta$ -lactamases são classificadas em 4 grupos (classes A, B, C e D), com base em suas sequências de aminoácidos e sítio ativo (37). Enzimas pertencentes a classe A, incluem as ESBLs e KPCs. As três famílias principais famílias de enzimas ESBLs descritas são os tipos TEM, SHV, e CTX-M (38). Os genes que codificam estas enzimas geralmente estão contidos em plasmídeos, podendo ser transmitidos entre bactérias da mesma espécie ou de gêneros/espécies diferentes (39). As ESBLs tem a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de primeira a quarta geração, e aztreonam, mas pode ser inibidas por inibidores de  $\beta$ -lactamases como clavulanato, sulbactam e tazobactam. Além de possuir a atividade hidrolítica de ESBLs, KPCs também hidrolisam carbapenêmicos (40).

Enzimas pertencentes a classe B são identificadas como metalo- $\beta$ -lactamases e incluem Nova Déli metalo- $\beta$ -lactamase (NDM), imipenem (IMP) e a metalo- $\beta$ -lactamase codificada pelo integron de Verona (VIM) (41). Estas enzimas tem a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de primeira a quarta geração, inibidores de  $\beta$ -lactamases e carbapenêmicos (42). O aztreonam não são suscetíveis a ação das metalo- $\beta$ -lactamases; entretanto, a maioria dos isolados também produz ESBLs, para o qual o aztreonam é geralmente ineficaz (35) e, por isso, há a necessidade do uso associado a outros antimicrobianos como ceftazidima-avibactam que neutralizam as ESBLs e carbapenemases (43).

Enzimas da classe C, como as cefalosporinases AmpCs, são induzíveis e codificadas na maioria das vezes pelo cromossomo sendo intrínsecas a numerosas espécies identificadas como organismos “MY SPACE” (*Morganella* spp., *Yersinia* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Enterobacter* spp.). AmpCs hidrolisam as penicilinas, cefalosporinas de primeira a terceira geração, inibidores de  $\beta$ -lactamases e aztreonam. A cefepima, uma cefalosporina de quarta geração, é pouco hidrolisada por AmpCs, portanto, muitos isolados são suscetíveis e a cefepima pode ser eficaz como tratamento (35). AmpC pode ser induzida por amoxicilina, ácido clavulânico, cefoxitina e cefalosporinas de primeira geração. Os carbapenêmicos também são

indutores potentes, mas permanecem ativos devido à falta de hidrólise mediada por AmpC significativa, enquanto outros  $\beta$ -lactâmicos são indutores mais fracos (44).

As enzimas da classe D são oxacilinasas ou OXA, assim chamadas por causa de sua alta atividade hidrolítica contra oxacilina (45). Essa família de enzimas é bem extensa e possui espectro de inibição extremamente variável. Algumas enzimas atuam como  $\beta$ -lactamases de espectro estreito, conferindo resistência às penicilinas e a quase todas as cefalosporinas, e outras atuam como carbapenemases (46). Entretanto ao contrário das enzimas da classe A, elas não são inibidas por inibidores de  $\beta$ -lactamase.  $\beta$ -lactamases de classe D são encontradas principalmente em bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Acinetobacter baumannii* (45). O grupo OXA-48 emergiu como uma carbapenemase implicada em vários surtos nosocomiais transmitida por plasmídeo e que disseminou entre Enterobacteriaceae, predominantemente *Klebsiella pneumoniae* (47).

Além de ESBLs Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases, como as que contêm *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs) e metalo- $\beta$ -lactamases de Nova Déli (NDMs), acabaram se tornando uma das maiores preocupações nas duas últimas décadas (35). Outra preocupação crescente se refere aos bacilos Gram-negativos não-fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, os quais são patógenos nosocomiais especialmente problemáticos em unidades de terapia intensiva devido a sua capacidade de adquirir elementos genéticos móveis que codificam determinantes de resistência múltipla ou pan-resistência além das  $\beta$ -lactamases, incluindo carbapenemases (35,44).

Os carbapenêmicos são freqüentemente usados para tratar infecções bacterianas causadas por bactérias Gram-negativas resistentes a cefalosporinas de espectro estendido e são normalmente hidrolisados por carbapenemases produzidas por membros de Enterobacteriaceae e bacilos Gram-negativos não fermentadores (48). Essas enzimas foram classificadas de acordo com a classificação de Ambler em classes A, B e D. As classes A e D são conhecidas como carbapenemases de serina e as classes B são chamadas de metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs) (49). As carbapenemases da Classe A compreendem cinco grupos: NMC, IMI, SME, KPC e GES, subdivididos em grupos mediados cromossomicamente e por plasmídeo. SME, NMC e IMI são mediados cromossomicamente, enquanto os grupos KPC e GES são, na maioria dos casos, mediados por plasmídeo. Estas enzimas possuem atividade hidrolítica para a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e aztreonam e foram encontradas em Enterobacteriaceae e *P. aeruginosa* (48).

As enzimas KPC estão entre as serinas carbapenemases de classe A codificadas por plasmídeo, principalmente de *K. pneumoniae*, e são consideradas as enzimas que representam uma ameaça potente aos antimicrobianos usados para tratar infecções. Genes KPC foram relatados em plasmídeos em espécies de enterobactérias tais como *E. coli*, *Salmonella* spp., *E. cloacae*, *Proteus mirabilis* e *K. oxytoca* (48). A disseminação não clonal também é altamente aparente em MBLs, especialmente NDM (50). Essas enzimas de classe B, que incluem NDM, GES, VIM e IMP, também se disseminaram globalmente (51). MBLs hidrolisam todos os  $\beta$ -lactâmicos, exceto monobactamâmicos, incluindo aztreonam, e não são inibidas por qualquer um dos inibidores de  $\beta$ -lactamase comercialmente disponíveis e suas bactérias hospedeiras frequentemente carregam mecanismos de resistência adicionais, como ESBLs (50,51).

A resistência à polimixinas (colistina e polimixina B) mediada por *mcr-1* (mobilized colistin resistance) pode contribuir para a disseminação de bactérias Gram-negativas pan-resistentes. O gene *mcr-1* mediado por plasmídeo codifica a fosfoetanolamina transferase que confere resistência à polimixina através da alteração da interação entre a colistina e a membrana externa das bactérias Gram-negativas (52). O primeiro relato de isolados de Enterobacteriaceae resistentes à colistina mediados *mcr-1* transmitido por plasmídeo foi realizado por Liu *et al.* (53). Desde então, a resistência adquirida às polimixinas é cada vez mais relatada em Enterobacteriaceae e, particularmente, em *Klebsiella pneumoniae* (54). Outras espécies bacterianas já demonstraram a expressão de *mcr-1* como *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* e *Salmonella enterica* (52). A rápida disseminação do gene *mcr-1* via transmissão horizontal tem sido considerada uma emergência global. Este aumento da resistência é extremamente preocupante, considerando que as polimixinas são antibióticos de último recurso para o tratamento de infecções por Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos (54).

De maneira sucinta, esses foram os principais mecanismos de resistência associadas a transferência plasmidial em bacilos Gram-negativos. Entretanto, devido à complexidade concernente os mecanismos de resistência, muitas outras enzimas podem estar associadas e muitas outras ainda podem emergir devido aos avanços das pesquisas. Embora ainda não se tenha avaliado o impacto da disseminação generalizada de isolados ou genes de resistência a antimicrobianos provenientes do ambiente e da produção animal para o ambiente hospitalar, algumas evidências apontam que esses locais podem atuar como reservatórios ambientais e sugerem que há um alto risco de que esses genes se espalhem para patógenos humanos tendo consequências futuras no tratamento de infecções (55).

## 1.6 DISSEMINAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES PROVENIENTES DA PRODUÇÃO RURAL

A resistência antimicrobiana na produção animal tem grande impacto na saúde animal e pode estar associada a infecções resistentes em humanos. O surgimento de resistência antimicrobiana em bactérias comensais ou patógenos animais contribui para a abundância de genes de resistência que podem ser posteriormente transferidos para patógenos humanos (17). O intestino de animais para alimentação servem como importantes reservatórios de genes de resistência antimicrobiana (21). Existe um reconhecimento crescente de que o uso generalizado de antimicrobianos na produção animal pode contribuir para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos comumente usados na medicina humana, em grande parte devido ao uso de antimicrobianos comuns em humanos e animais produtores de alimentos (56).

A transmissão zoonótica de resistência a antimicrobianos de suínos para produtores rurais já foi verificada em alguns estudos (57–60). Isolados de *E. coli* produtores de ESBL com os mesmos genes de  $\beta$ -lactamase, perfis de resistência a antibióticos, tipos de sequência identificadas por ERIC e MLSTs foram detectados em 34 de 60 porcos (56,7%) e 8 de 40 trabalhadores agrícolas (20,0%) pertencentes as mesmas fazendas, indicando possível transferência de resistência antimicrobiana entre porcos e trabalhadores agrícolas (57). Em outro estudo, foi possível verificar a provável transmissão horizontal de ESBLs de animais de produção (gado, suínos e aves) para trabalhadores rurais (58). De um total de 73 trabalhadores rurais, cinco (6,8%) eram portadores de ESBLs (três trabalhadores de fazendas de gado e dois trabalhadores de fazendas de suínos), sendo que dois pares produtor-suíno e produtor-bovino portavam os mesmos genes ESBLs, mas não compartilhavam o mesmo tipo de sequências MLSTs (58). Entretanto, um único isolado de um produtor rural bovino compartilhou um tipo de sequência MLST do gene CTX-M idêntico ao encontrado na amostra fecal da mesma fazenda, sugerindo que os isolados descendiam do mesmo clone de *E. coli* e indicando a possível transmissão zoonótica.

Plasmídeos carregando genes de ESBL de interesse clínico podem ser facilmente transferidos entre animais e humanos através do contato direto. A presença de CTX-M-1 foi detectada em 56 de 70 amostras de suínos, 20 de 30 pares porca-leitão testados e três trabalhadores rurais de duas fazendas avaliadas (59). A alta diversidade genética observada no estudo sugere que a aquisição de plasmídeos carreadores do gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> por trabalhadores agrícolas ocorreu pelo contato direto com os porcos e foi predominantemente devida à

disseminação horizontal de plasmídeos entre linhagens distintas de *E. coli.*, provavelmente selecionada por exposição a antibióticos e não foi resultado da disseminação clonal. Entretanto, a ocorrência de transmissão clonal foi verificada em um estudo que identificou dois isolados humanos que abrigavam tipos de genes ESBL semelhantes e tinham sequência e tipos de plasmídeo idênticos (*E. coli* ST-453, *bla*CTX-M-1, IncI1) à de dois suínos nas respectivas granjas em que trabalhavam (60).

Os resultados destes e de outros estudos fornecem indícios de que bactérias resistentes podem ser trocadas entre animais e trabalhadores agrícolas. Trabalhadores agrícolas parecem ter um maior risco de carregar ESBLs do que a população em geral, devido ao fato de terem mais chances de entrarem em contato direto com animais portadores de bactérias resistentes e que o contato frequente com animais pode ser um fator de risco para o transporte humano de ESBL (57). Embora algumas pesquisas já tenham buscado pesquisar o perfil de resistência a antimicrobianos na produção de suinocultura brasileira, até o momento não foi encontrado ainda nenhum trabalho no Brasil que buscasse identificar o perfil de suscetibilidade de bactérias das mãos dos trabalhadores que estão em contato direto com os suínos.

Considerando (i) a importância mundial da produção brasileira de suínos; (ii) a preocupação global em relação a resistência aos antimicrobianos; (iii) a vigilância ainda restrita por parte dos órgãos fiscalizadores e de saúde pública brasileiros; (iv) as evidências crescentes em relação à disseminação de resistência na produção animal pelo contato dos trabalhadores com os animais; (v) e o conhecimento ainda limitado em relação a transferência de determinantes de resistência de fontes de origem animal/alimentar para humanos; surge a necessidade de se conhecer melhor o perfil de susceptibilidade deste reservatório ambiental para se monitorar a ocorrência de bactérias resistentes, e assim contribuir para a formulação de medidas que busquem mitigar a sua propagação potencial.

## 1.7 OBJETIVOS

### 1.7.1 Objetivo Geral

Identificar e avaliar o perfil de susceptibilidade de bacilos Gram-negativos isolados das mãos dos trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

### **1.7.2 Objetivos específicos**

- a) Identificar os isolados de bactérias Gram-negativas presentes na microbiota das mãos dos trabalhadores das granjas de suínos;
- b) Identificar e relacionar o perfil de susceptibilidade das diferentes espécies de bacilos Gram-negativos isolados das mãos dos trabalhadores das granjas de suínos com dados existentes na literatura;
- c) Identificar fenotipicamente a presença de Enterobacteriaceae produtoras de ESBL nos isolados das mãos dos trabalhadores das granjas de suínos.

## **2 ARTIGO CIENTÍFICO**

O trabalho intitulado “Bacilos Gram-negativos multirresistentes isolados das mãos de trabalhadores de granjas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil” está apresentado na forma de artigo científico e obedece às normas da revista selecionada, *Frontiers in Microbiology*, cujas normas constam em anexo.

# Bacilos Gram-negativos multirresistentes isolados das mãos de trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil

1 **Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima<sup>1</sup>, Silvia Adriana Mayer Lentz<sup>1</sup>, Andreza**  
2 **Francisco Martins<sup>1\*</sup>**

3 <sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Aplicada, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de  
4 Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,  
5 Brasil

6 **\* Correspondência:**

7 Autor correspondente

8 andrezafm20@gmail.com

9 **Palavras-chave: perfil de suscetibilidade, resistência antimicrobiana, pecuária, suinocultura,**  
10 **trabalhadores rurais.**

## 11 **Resumo**

12 O amplo uso de antimicrobianos na pecuária é preocupante devido a crescente taxa de resistência  
13 antimicrobiana. Embora os mecanismos de transferência de determinantes de resistência de animais  
14 para humanos não tenham sido elucidados adequadamente, evidências consideráveis apontam para a  
15 transferência de resistência antimicrobiana de animais de produção para trabalhadores agrícolas. Nesse  
16 sentido, surge a necessidade de se monitorar o perfil de suscetibilidade de bactérias presentes na  
17 microbiota de trabalhadores que estão em contato direto com os animais, para que se possam  
18 implementar barreiras para controle da disseminação de resistência a antimicrobianos. O objetivo desse  
19 trabalho foi identificar e avaliar o perfil de susceptibilidade de bacilos Gram-negativos (BGN) isolados  
20 das mãos dos trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Os  
21 isolados de BGN foram provenientes das mãos de 58 trabalhadores de 37 granjas produtoras de suínos  
22 no estado do Rio Grande do Sul, Brasil coletados entre Março e Setembro de 2018. Os isolados foram  
23 identificados por MALDI-TOF, submetidos ao teste de suscetibilidade por disco difusão e triagem de  
24 Enterobacteriaceae produtoras de ESBL pelo método de sinergismo de disco duplo (TSDD). Dos 67  
25 isolados selecionados no estudo, 65 (97%) foram identificados por MALDI-TOF com escore acima de  
26 1,7; sendo 45(69,2%) BGN fermentadores pertencentes a família Enterobacteriaceae e 20 (30,8%)  
27 BGN não fermentadores, que correspondem a 14 (21,5%) *Acinetobacter* spp., 5(7,7%) *Pseudomonas*  
28 spp. e 1(1,5%) *Stenotrophomonas maltophilia*. Entre estes isolados, 19 (42,2%) BGN não  
29 fermentadores e 14 (70%) BGN fermentadores foram não suscetíveis a pelo menos um antimicrobiano  
30 testado. Dois (3,1%) isolados identificados como *Pantoea agglomerans* com perfil de multirresistência  
31 e produtores de ESBL. Através destes resultados podemos observar que a microbiota das mãos dos  
32 trabalhadores carrega bactérias multirresistentes que estão presentes no ambiente da fazenda. Assim,  
33 reforça-se a necessidade de formular e implementar medidas de controle e vigilância que busquem  
34 mitigar a propagação potencial de genes de resistência entre homens, animais e ambiente.

35

36 **1. Introdução**

37 A utilização indiscriminada de antibióticos como estratégia terapêutica clínica e na produção  
38 animal para a melhoria da eficiência alimentar e prevenção a possíveis infecções acabou contribuindo  
39 para a seleção de microrganismos resistentes a antimicrobianos no ambiente. A resistência  
40 antimicrobiana tem sido considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública da  
41 atualidade e representa uma ameaça global (1). Um enorme empenho, em âmbito mundial, tem sido  
42 empreendido na tentativa de reduzir a disseminação da resistência antimicrobiana. A Organização das  
43 Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a  
44 Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) intensificaram ações conjuntas por meio de um plano de  
45 ação global no combate a ameaça que representa a resistência a antimicrobianos (2). Através do  
46 reconhecimento da complexidade ecológica da interação de microrganismos diversos entre humanos,  
47 animais e ambiente, há um esforço integrado na busca pela redução da resistência a antimicrobianos  
48 através do uso da abordagem One Health (3).

49 A resistência dos bacilos Gram-negativos (BGNs) aos antibióticos mais comumente  
50 administrados na medicina humana aumentou significativamente na última década (4), tornando estes  
51 patógenos uma das maiores preocupações em relação a disseminação da resistência (5). Isso ocorre  
52 devido às opções limitadas de tratamento, à facilidade da transferência de genes de resistência mediada  
53 por plasmídeos entre o BGNs, à ampla distribuição de Enterobacteriaceae como parte do microbioma  
54 humano, à colonização assintomática presente em certos indivíduos e à maior mortalidade associada a  
55 Enterobacteriaceae resistente a carbapenêmicos em comparação com cepas suscetíveis (6). Embora a  
56 exposição a animais seja considerada um fator de risco, as evidências para uma transferência direta de  
57 Enterobacteriaceae resistentes a antimicrobianos de animais para humanos por meio de contatos  
58 próximos ainda são limitadas, da mesma forma em que também não está estabelecida a extensão em  
59 que os alimentos contribuem para a transmissão potencial de resistência (7).

60 Ao longo dos anos, os antimicrobianos foram utilizados na criação de animais para promoção do  
61 crescimento, melhoria da eficiência alimentar, profilaxia e também no tratamento de doenças  
62 infecciosas (7). O uso amplo e crescente de antimicrobianos na pecuária, em consequência da crescente  
63 demanda global do consumo de proteína animal, é uma preocupação considerável em resposta a  
64 ameaça de resistência antimicrobiana (8). Isso porque há um reconhecimento crescente de que o uso  
65 de antimicrobianos na produção animal de alimentos pode contribuir para o desenvolvimento de  
66 resistência aos antimicrobianos comumente usados na medicina humana (9). Embora a transferência  
67 de determinantes de resistência de animais para humanos seja difícil de rastrear, e que o papel desses  
68 reservatórios animais na resistência antimicrobiana clínica não tenha sido elucidado adequadamente  
69 (10), evidências consideráveis apontam para a disseminação generalizada de resistência antimicrobiana  
70 originadas da produção animal para seres humanos.

71 Bactérias comensais resistentes a antimicrobianos provenientes de animais de produção podem  
72 ser transferidas para seres humanos através do contato direto com os animais, ou indiretamente, através  
73 de alimentos ou do meio ambiente (11). Em alguns casos de transmissão por contato direto, as bactérias  
74 também podem ser transmitidas de humanos para os animais com os quais estão em contato (11). Em  
75 um trabalho recente (12), através de uma revisão sistemática e metanálise da literatura, foi identificado  
76 que as intervenções que restringem o uso de antibióticos na produção animal estão associadas a uma  
77 redução na prevalência de resistência a antibióticos nos animais de produção, e sugerem que esse efeito  
78 potencialmente benéfico se estende aos agricultores e aqueles em contato direto com os animais. Esse  
79 trabalho sugere consistentemente que bactérias resistentes podem ser trocadas entre animais e

## **Bacilos Gram-negativos multirresistentes isolados das mãos de trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil**

80 trabalhadores agrícolas, com as evidências mais fracas e indiretas para transmissão a outras populações  
81 humanas (12). Essas evidências conjuntas apontam para a necessidade de identificação de resistência  
82 das bactérias provenientes da produção animal, e também indicam a necessidade de se monitorar o  
83 perfil de suscetibilidade de bactérias presentes na microbiota de trabalhadores que estão em contato  
84 direto com os animais para que se possam implementar barreiras para controle da disseminação de  
85 resistência a antimicrobianos. Alguns estudos já têm buscado pesquisar o perfil de resistência a  
86 antimicrobianos na suinocultura brasileira, mas até o momento não foi encontrado ainda nenhum  
87 trabalho no Brasil que buscasse identificar o perfil de suscetibilidade de bactérias das mãos dos  
88 trabalhadores que estão em contato direto com os suínos. Diante da emergência da propagação  
89 generalizada da resistência antimicrobiana por bactérias comensais presente na microbiota de homens  
90 e animais, o objetivo desse estudo foi identificar e avaliar o perfil de suscetibilidade de bacilos Gram-  
91 negativos isolados das mãos dos trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande  
92 do Sul, Brasil.

### **93 1. Materiais e métodos**

#### **94 Declaração de ética**

95 Esse estudo integra o projeto intitulado “Caracterização de genes de resistência de isolados de  
96 *Escherichia coli* provenientes de suínos, avaliação dos diferentes perfis clonais circulantes e sua  
97 relação com resíduos de antibióticos no ambiente e na carne in natura”. O projeto foi previamente  
98 aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande  
99 do Sul (UFRGS) registrado sob o número 33494, e pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)  
100 do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) registrado sob o número 180672. As amostras das  
101 mãos dos trabalhadores de fazendas de suinocultura foram coletadas após a concordância dos  
102 participantes através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

#### **103 Coleta de amostras**

104 Entre Março e Setembro de 2018, foram coletados 58 swabs das mãos de trabalhadores de 37  
105 granjas produtoras de suínos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Tabela 1). As amostras foram  
106 coletadas com swabs estéreis e inoculadas em meio de transporte Stuart. Os isolados de bacilos Gram-  
107 negativos utilizados neste estudo foram previamente selecionados e identificados através de testes  
108 bioquímicos e testes fenotípicos, e armazenados a -20 °C em glicerol 16%.

#### **109 Identificação pelo MALDI-TOF**

110 Os isolados foram inoculados em caldo BHI (Brain Heart Infusion) (KASVI®, Brasil) e  
111 incubados a 37 °C por 24 h até ser observada a turvação do meio de cultura. Eles foram então semeados  
112 em placas contendo meio Mueller-Hinton (KASVI®, Brasil) e incubados a 37 °C por 24 h para a  
113 realização da identificação e dos testes de suscetibilidade. A confirmação da identificação dos isolados  
114 foi realizada em duplicata pelo método de espectrometria de massas através da técnica direta pelo  
115 MALDI Biotyper 4.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) seguindo as instruções do manual  
116 do fabricante do equipamento (13).

#### **117 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos**

## Bacilos Gram-negativos multirresistentes isolados das mãos de trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil

118 O perfil de susceptibilidade foi realizado pelo método de disco difusão de acordo com a  
119 padronização estabelecida pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (14). Para validação do  
120 teste, foi utilizada uma cepa padrão *Escherichia coli* ATCC 25922. Foram utilizados 20 agentes  
121 antimicrobianos: AK30, amicacina; AMC30, amoxicilina-ácido clavulânico; APS20, ampicilina-  
122 sulbactam; ATM30, aztreonam; FEP30, cefepima; CTX30, cefotaxima; CAZ30, ceftazidima; EFT30,  
123 ceftiofur; CRO30, ceftriaxona; CIP5, ciprofloxacina; ENR5, enrofloxacina; CN10, gentamicina;  
124 IMP10, imipenem; LEV5, levofloxacina; MEM10, meropenem; PIT110, piperaciclina-tazobactam;  
125 SXT25, sulfametoxazol-trimetoprim; TET30, tetraciclina; TIC85, ticarcilina-clavulanato; e TOB10,  
126 tobramicina (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, França).

### 127 Detecção fenotípica de ESBL

128 A detecção fenotípica de ESBL foi realizada pelo método de sinergismo de disco duplo (TSDD)  
129 de acordo com a padronização estabelecida pelo CLSI (14) concomitante ao teste de disco difusão. O  
130 teste foi realizado aplicando três discos contendo cefalosporinas – cefotaxima, ceftazidima e cefepima  
131 – próximos a um disco com amoxicilina-ácido clavulânico. Os halos foram medidos e o resultado  
132 verificado através da observação do aumento das zonas de inibição em torno de qualquer disco de  
133 cefalosporinas em direção do disco contendo o ácido clavulânico.

## 134 2. Resultados

### 135 Identificação bacteriana

136 No total, foram isoladas 67 cepas de bacilos Gram-negativos, sendo 65 (97%) identificados por  
137 espectrometria de massas MALDI-TOF com escore acima de 1,7 (Tabela 1). As identificações  
138 baseadas em MALDI-TOF resultaram em 45(69,2%) bacilos Gram-negativos fermentadores  
139 pertencentes a família Enterobacteriaceae e 20 (30,8%) bacilos Gram-negativos não fermentadores,  
140 sendo 14 (21,5%) *Acinetobacter* spp., 5 (7,7%) *Pseudomonas* spp. e 1(1,5%) *Stenotrophomonas*  
141 *maltophilia*.

### 142 Perfis fenotípicos de resistência

143 Os resultados do perfil de susceptibilidade a partir do teste de disco difusão estão apresentados  
144 na Tabela 2. Dos 45 isolados de BGN fermentadores pertencentes a família Enterobacteriaceae, 19  
145 (42,2%) isolados foram não-suscetíveis a pelo menos um dos antimicrobianos testados. A  
146 caracterização fenotípica do perfil de suscetibilidade permitiu identificar dois isolados (3,1%) de  
147 *Pantoea agglomerans* multirresistentes a aminoglicosídeos, a carbapenêmicos e cefalosporinas de  
148 terceira geração; e positivos para o TSDD, sendo considerados produtores de ESBLs. Outros BGNs  
149 fermentadores resistentes e intermediários as diferentes classes de antimicrobianos foram identificados,  
150 incluindo *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella varicola* e *Klebsiella pneumoniae*  
151 resistentes a pelo menos uma cefalosporina de terceira geração e intermediários a carbapenêmicos.

152 Dos 20 BGN não fermentadores, 14 (70%) não foram suscetíveis a pelo menos um dos  
153 antimicrobianos testados. Dos 14 isolados de *Acinetobacter* spp., apenas o isolado de *Acinetobacter*  
154 *ursingii* apresentou perfil de resistência a ceftazidima e foi intermediário para ciprofloxacina e  
155 amicacina; 12 isolados de *Acinetobacter baumannii* foram intermediários para ceftriaxona, sendo um  
156 deles intermediário também para sulfametaxazol-trimetoprim e piperaciclina-tazobactam, dois deles  
157 intermediários para ceftazidima e um para imipenem. O isolado de *Pseudomonas aeruginosa* foi

## Bacilos Gram-negativos multirresistentes isolados das mãos de trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil

158 intermediário para imipenem. Alguns isolados identificados não são padronizados no CLSI para o teste  
159 de disco difusão, sendo necessária a realização do teste em microdiluição em caldo.

### 160 3. Discussão

161 O estado do Rio Grande do Sul ocupa uma posição de destaque no mercado brasileiro e mundial  
162 de suinocultura. No entanto, devido a utilização de antimicrobianos na produção animal, é considerada  
163 uma região emergente na disseminação de resistência a antimicrobianos (15). A resistência  
164 antimicrobiana na suinocultura tem grande impacto na saúde animal e pode estar associada a infecções  
165 resistentes em humanos. Ao longo das últimas décadas, a utilização de antimicrobianos na produção  
166 de suínos buscando a melhoria da eficiência alimentar, profilaxia, metafilaxia e o tratamento de  
167 doenças infecciosas favoreceu a pressão de seleção de microrganismos resistentes e a disseminação de  
168 mecanismos de resistência. Evidências recentes sugerem que bactérias ambientais e de importância  
169 clínica provenientes da cadeia de produção de alimentos de origem animal são carreadoras de  
170 elementos genéticos móveis contendo genes de resistência e conferem um alto risco de disseminação  
171 para patógenos humanos podendo levar a consequências futuras no tratamento de infecções (11). O  
172 trato gastrointestinal de suínos e humanos abriga bactérias comensais como os bacilos Gram-negativos  
173 (BGNs) que podem atuar como reservatório de genes de resistência que podem potencialmente ser  
174 transferidos.

175 A presença de BGNs pertencentes ao grupo das Enterobacteriaceae resistentes a cefalosporinas de  
176 terceira geração e carbapenêmicos em suínos e em trabalhadores de granjas de suinocultura já foi  
177 relatada em diversos trabalhos, assim como constatamos no nosso estudo. A resistência a  
178 cefalosporinas foi detectada em 86 isolados de trabalhadores e 89 isolados de amostras fecais de porcos  
179 resistentes a cefotaxima em 100 fazendas de suinocultura (16). Além da resistência a cefotaxima  
180 (CTX), o estudo também avaliou a presença de resistência a outras cefalosporinas de terceira geração,  
181 como cefuroxima (CXM), ceftriaxona (CRO), cefpodoxima (CPD), cefoperazona (CFP) e cefoxitina  
182 (FOX). A presença de ESBL *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> foi identificada em 66 de isolados de porcos e 69  
183 isolados de trabalhadores. O estudo sugere que a presença do mesmo perfil fenotípico de  
184 suscetibilidade a cefalosporinas seja um indício para transmissão de resistência entre porcos e  
185 suinocultores, embora não tenha realizado investigação da disseminação dos genes ESBLs entre os  
186 isolados.

187 No nosso estudo, encontramos resultados semelhantes ao artigo publicado por Fischer *et al.* (17)  
188 que avaliou o perfil de suscetibilidade de Enterobacteriaceae isoladas das narinas de 114 pessoas  
189 expostas a suínos. Foram identificados isolados de *Pantoea agglomerans* (n=13), *Citrobacter koseri*  
190 (n=9), *Citrobacter freundii* (n=3), *Enterobacter aerogenes* (n=4), *Enterobacter cloacae* (n=3),  
191 *Klebsiella pneumoniae* (n=8), *Klebsiella oxytoca* (n=3) e outras espécies de Enterobacteriaceae com  
192 perfil de resistência a cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina, meropenem, sulfametaxazol-  
193 trimetoprim, gentamicina e tigeciclina, mas não foi detectada a presença de ESBLs (17). A presença  
194 de isolados de Enterobacteriaceae resistentes ou intermediários a cefalosporinas de terceira geração e  
195 carbapenêmicos demonstram uma preocupação em relação a possível transmissão zoonótica entre  
196 porcos e os trabalhadores de granjas de suinocultura.

197 Outros estudos além de identificar a presença de ESBLs buscam investigar seu papel na possível  
198 disseminação zoonótica de resistência a antimicrobianos (18–21). Isolados produtores de ESBL com  
199 os mesmos genes de  $\beta$ -lactamase, perfis de resistência a antibióticos, tipos de sequência MLST foram  
200 detectados em porcos e trabalhadores agrícolas nas mesmas fazendas (18). Em outro estudo, a presença  
201 de CTX-M-1 foi detectada em 56 das 70 amostras de suínos, 20 dos 30 pares porca-leitão testados e

## Bacilos Gram-negativos multirresistentes isolados das mãos de trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil

202 três trabalhadores rurais de duas fazendas avaliadas (20). A alta diversidade genética observada no  
203 estudo sugere que a aquisição do gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> por trabalhadores agrícolas ocorreu pelo contato direto  
204 com os porcos e pela transmissão horizontal de plasmídeos entre linhagens distintas de *Escherichia*  
205 *coli*. Entretanto, em outro estudo, a prevalência da presença de ESBL em 142 suinocultores foi  
206 identificada em 16 isolados de 12 pessoas fenotipicamente confirmadas como produtores de ESBLs:  
207 *Escherichia coli* (n = 13), *Citrobacter freundii* (n = 1), *Enterobacter cloacae* (n = 1) e *Proteus vulgaris*  
208 (n = 1) (19). No estudo, foi evidenciada a presença do mesmo perfil clonal de ESBLs (*E. coli* ST-453,  
209 *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, IncI1) em isolados de dois suinocultores e porcos da mesma fazenda. Em conjunto, esses  
210 estudos indicam a possível disseminação zoonótica da resistência antimicrobiana entre porcos e  
211 trabalhadores agrícolas, e sugerem que a disseminação de ESBLs pode ocorrer tanto via transmissão  
212 clonal quanto disseminação horizontal de plasmídeos entre linhagens distintas provavelmente  
213 selecionada devido a exposição a antibióticos.

214 Em uma estimativa realizada em fazendas suíças 6,9% (2/29) amostras fecais de leitões, 2,6%  
215 (2/77) amostras nasais de porcos e 12% (3/25) amostras fecais dos suinocultores foram detectados  
216 como portadores *Escherichia coli* produtora de ESBL pertencentes ao grupo CTX-M (22). Nestes  
217 isolados, não foi identificada resistência a carbapenêmicos e nem detectado nenhum produtor de AmpC  
218 mediado por plasmídeo. Entretanto, a presença da resistência a carbapenêmicos já foi identificada em  
219 um isolado de *Escherichia coli* produtor de OXA-48 com fenótipo de resistência para alguns beta-  
220 lactâmicos (ampicilina, cefotaxima, cefepima, temocilina), incluindo os carbapenêmicos (imipenem,  
221 meropenem, ertapenem) em uma amostra fecal de suíno de uma fazenda na Alemanha (23). De acordo  
222 com os pesquisadores, o plasmídeo do tipo p-OXA-48 encontrado no estudo parece ser globalmente  
223 distribuído entre várias espécies bacterianas, sendo frequentemente associado a isolados de *Klebsiella*  
224 spp. e transmitido por conjugação entre as Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*,  
225 *Enterobacter asburie*, *Klebsiella oxytoca* e *Salmonella thyphimurium*). A via de introdução deste  
226 plasmídeo na produção de suínos é desconhecida, mas os pesquisadores especulam que, devido a sua  
227 forte correlação com isolados humanos, possa ter ocorrido a transmissão através do contato humano  
228 com os suínos.

229 No Brasil, a presença de genes codificantes de  $\beta$ -lactamases *bla*<sub>CTX-M-Gp1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-Gp9</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>,  
230 *bla*<sub>VEB</sub> e *bla*<sub>OXA-1-like</sub> foi identificada em amostras de fezes, solo e água em granjas de suinocultura (24).  
231 A determinação da presença de  $\beta$ -lactamases nesta granja de produção de suínos é um indício da  
232 presença da resistência a antimicrobianos na cadeia de produção de suinocultura brasileira. A  
233 utilização extensiva de antimicrobianos na suinocultura brasileira potencialmente pode promover o  
234 aumento da pressão de seleção a antimicrobianos e contribuir para a disseminação de resistência a  
235 antimicrobianos. Entretanto, não foi observado nenhum estudo no país que busque avaliar a extensão  
236 da disseminação de resistência a antimicrobianos aos trabalhadores de granjas produtoras de suínos.

237 O perfil de suscetibilidade dos dois isolados de *Pantoea agglomerans* multirresistentes e  
238 produtores de ESBLs identificados neste estudo se tornam uma preocupação, uma vez que a pressão  
239 de seleção em reservatórios ambientais, como a produção de suinocultura, possa estar atuando  
240 potencialmente na seleção de genes de resistência entre BGNs e disseminação através de elementos  
241 genéticos móveis para bactérias ambientais que podem por vezes causar infecções oportunistas para  
242 seres humanos. *Pantoea agglomerans* tem sido associada a infecções de feridas, trato urinário,  
243 pneumonia, corrente sanguínea, meningite, bacteremia e septicemia em crianças e UTI neonatais (25–  
244 27). As infecções por *Pantoea agglomerans* resistentes a carbapenêmicos podem ser fatais (25).  
245 Embora não haja uma correlação da disseminação da resistência a antimicrobianos provenientes da  
246 produção animal para o ambiente hospitalar, a possibilidade da disseminação zoonótica de BGNs

## Bacilos Gram-negativos multirresistentes isolados das mãos de trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil

247 resistentes a carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração provenientes da suinocultura se torna  
248 uma emergência e por isso mais estudos são necessários para compreender os padrões de disseminação  
249 e mecanismos de resistência aos medicamentos dessas bactérias.

250 A partir da caracterização do perfil fenotípico também dos BGNs não fermentadores, foi possível  
251 identificar a presença de *Acinetobacter ursingii* resistente a ceftazidima, isolados de *Acinetobacter*  
252 *baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* com perfil intermediário aos carbapenêmicos, cefalosporinas e  
253 outros grupos de antimicrobianos. A presença dos gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas* já foi  
254 identificada nos bioaerossóis em fazendas de suínos e em amostras nasais de trabalhadores de  
255 suinocultura (28) e já foi relacionada com a persistência de genes de resistência em solos adubados  
256 com esterco de suínos (29). No Brasil, a presença de *Pseudomonas* spp. com perfil de multirresistência  
257 foi identificada em uma estação de tratamento de efluentes que processa dejetos provenientes de  
258 matadouros de suínos (30). Dos 34 isolados, 16 (47,5%) apresentaram resistência a todos os  
259 antimicrobianos testados (amicacina, aztreonam, cefepima, ceftazidima, ciprofloxacina,  
260 estreptomicina, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam e tobramicina),  
261 demonstrando que a presença de *Pseudomonas* spp. com perfil de multirresistência proveniente da  
262 produção de suínos pode ser potencialmente disseminada no ambiente. O perfil de multirresistência  
263 inerente a *Pseudomonas aeruginosa* é devido à resistência intrínseca, mediada principalmente por uma  
264 combinação de mecanismos como impermeabilidade, presença de genes que codificam  $\beta$ -lactamases e  
265 presença de bombas de efluxo. A presença da oxacilinase constitutiva *bla*<sub>OXA-50</sub>, da cefalosporinase  
266 AmpC induzível e dos sistemas de efluxo MexAB-OprM e MexXYOprM conferem resistência a  
267 a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos e outros grupos de antimicrobianos (31).

268 A presença de *Acinetobacter baumannii* também resistente a carbapenêmicos foi reportada em  
269 amostras de esterco de suínos (32). O mecanismo de resistência aos carbapenêmicos de *Acinetobacter*  
270 *baumannii* ocorre devido a associação de  $\beta$ -lactamases (carbapenemases) intrínsecas e adquiridas (33).  
271 Nos dois isolados identificados no estudo (32), foi detectada a presença do gene intrínseco *bla*<sub>OXA-66</sub> e  
272 do gene *bla*<sub>OXA-23</sub> localizado em plasmídeos adquiridos, encontrado frequentemente em isolados  
273 clínicos, demonstrando a conectividade entre suínos e a população humana na cadeia de produção  
274 animal. Enquanto os genes de resistência aos carbapenêmicos codificados cromossomicamente  
275 intrínsecos *bla*<sub>OXA-51</sub> são de baixa relevância epidemiológica, os genes *bla*<sub>OXA-23</sub> localizados no  
276 plasmídeo podem ser auto transferíveis (34), o que ocasiona numerosos problemas de saúde pública.  
277 A presença dos genes *bla*<sub>OXA-51</sub> e *bla*<sub>AmpC</sub> é o fator responsável pela expressão de resistência intrínseca  
278 aos carbapenêmicos e ceftazidima, respectivamente (35). Por isso, nas amostras identificadas em nosso  
279 estudo foi possível identificar isolados intemediários ao imipenem e resistente a ceftazidima que pode  
280 estar associado a resistência intrínseca. Entretanto, também foram identificadas espécies intermediárias  
281 a amicacina, ceftriaxona, ciprofloxacina, piperacilina-tazobactam, sulfametaxazol-trimetoprim. (36).

282 Apesar deste estudo não ter realizado uma comparação com o perfil de suscetibilidade dos porcos  
283 ao qual as pessoas tem contato, os resultados apresentados em conjunto com os dados da literatura  
284 sugerem que pessoas expostas a suínos podem carrear bactérias pertencentes a Enterobacteriaceae  
285 resistentes a antimicrobianos. A possibilidade de disseminação de Enterobacteriaceae resistentes a  
286 antimicrobianos, como cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos, tem se tornado uma  
287 emergência de saúde pública. As cefalosporinas de terceira geração, amplamente utilizadas tanto pela  
288 medicina humana quanto na produção animal (3), tem sua resistência mediada principalmente por  
289 genes ESBLs e AmpC, que podem ser transmitidas horizontalmente entre Enterobacteriaceae por  
290 plasmídeos (36). Esses genes são frequentemente co-localizados a outros genes que codificam a  
291 resistência a diferentes classes de antimicrobianos, incluindo tetraciclinas, aminoglicosídeos e

## **Bacilos Gram-negativos multirresistentes isolados das mãos de trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil**

292 sulfonamidas (3). Como consequência, a disseminação de elementos genéticos móveis, como  
293 plasmídeos, contendo genes que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos reduz  
294 muito o repertório de escolha pela clínica médica humana de medicamentos disponíveis para o  
295 tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas. Os carbapenêmicos são considerados  
296 a terapia de última linha utilizados no tratamento de infecções graves em humanos causadas por  
297 bactérias Gram-negativas multirresistentes (37) e ativos contra BGNs produtores de ESBL e AmpC  
298 (38).

299 Embora este trabalho tenha contribuído para a identificação do perfil de suscetibilidade de BGNs  
300 das mãos dos trabalhadores de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, esse estudo teve algumas  
301 limitações tais como número amostral reduzido, a não realização da correlação com o perfil de  
302 suscetibilidade dos suínos das granjas em que as amostras foram coletadas, e a ausência da  
303 identificação dos genes de resistência presentes nos isolados analisados. Por isso, mais estudos são  
304 necessários no intuito de compreender os mecanismos envolvidos na transmissão de resistência na  
305 cadeia de produção de suinocultura e a potencial disseminação ambiental e nosocomial.

### **306 4. Conclusão**

307 A resistência a antimicrobianos na produção de suínos com a potencial transmissão para os  
308 trabalhadores de suinocultura é uma emergência de saúde pública. A presença de Bacilos Gram  
309 negativos com perfil de resistência a cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos, mesmo que  
310 em bactérias ambientais (as quais podem ser patógenos oportunistas), demonstram que a produção de  
311 suínos pode atuar como um importante reservatório ambiental que exerce pressão de seleção  
312 favorecendo a resistência. Embora ainda não haja evidências da correlação da disseminação da  
313 resistência bacteriana proveniente da produção suínos para o ambiente hospitalar no estado do Rio  
314 Grande do Sul, esse trabalho sugere que a presença de bactérias de importância clínica com perfil de  
315 resistência nas mãos de trabalhadores de granjas de suinocultura pode ser um fator importante na  
316 transmissão direta ou indireta da resistência para unidades de saúde e não pode ser descartada. Através  
317 destes resultados podemos observar que a microbiota das mãos dos trabalhadores carrega bactérias  
318 multirresistentes que estão presentes no ambiente da fazenda. Apesar de existirem programas  
319 governamentais brasileiros visando a prevenção da resistência a antimicrobianos na produção animal,  
320 o monitoramento e a fiscalização ainda são muito incipientes. Assim, reforça-se a necessidade de  
321 formular e implementar medidas de controle e vigilância, que busquem mitigar a propagação potencial  
322 de genes de resistência entre homens, animais e ambiente. Por isso, mais estudos são necessários no  
323 estado e no país de modo a identificar e correlacionar o perfil de suscetibilidade, a presença de genes  
324 de resistência bacteriana e a clonalidade dos isolados oriundos da suinocultura com isolados de  
325 amostras clínicas.

### **326 5. Conflitos de interesse**

327 Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais  
328 ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

### **329 6. Contribuição dos autores**

330 SAML foi responsável pela coleta, cultivo e isolamento das amostras. SAML e AMDLL  
331 realizaram a identificação fenotípica dos isolados. AMDLL conduziu a identificação do perfil de

## Bacilos Gram-negativos multirresistentes isolados das mãos de trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil

332 suscetibilidade a antimicrobianos e detecção fenotípica da presença de ESBL. AFM coordenou o  
333 estudo, revisou e editou o manuscrito.

### 334 7. Financiamento

335 Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
336 (CNPq); Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, Brasília, Brasil; Instituto  
337 Nacional de Pesquisa em Resistência Antimicrobiana (INPRA), Brasil (INCT/CNPq: 465718/2014-0).

### 338 8. Agradecimentos

339 Gostaríamos de agradecer ao Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS)  
340 do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por sua assistência na identificação fenotípica dos  
341 isolados através da técnica de MALDI-TOF.

### 342 9. Referências

- 343 1. van Duin D, Paterson DL. Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and  
344 Lessons Learned. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2016;30(2):377–90. Available from:  
345 <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.004>
- 346 2. WHO. International partnership to address human-animal-environment health risks gets a  
347 boost. [Internet]. World Health Organization. 2018 [cited 2020 Mar 3]. Available from:  
348 [https://www.who.int/news-room/detail/30-05-2018-international-partnership-to-address-](https://www.who.int/news-room/detail/30-05-2018-international-partnership-to-address-human-animal-environment-health-risks-gets-a-boost)  
349 [human-animal-environment-health-risks-gets-a-boost](https://www.who.int/news-room/detail/30-05-2018-international-partnership-to-address-human-animal-environment-health-risks-gets-a-boost)
- 350 3. Mcewen SA, Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: A One Health Colloquium. *Microbiol*  
351 *Spectr* [Internet]. 2017;6(2):1–26. Available from: [www.chathamhouse.org](http://www.chathamhouse.org)
- 352 4. Ruppé É, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative  
353 bacilli. *Ann Intensive Care*. 2015;5(1).
- 354 5. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States. *Centers Dis Control Prev*. 2019;148.
- 355 6. Vasoo S, Barreto JN, Tosh PK. Emerging Issues in Gram-Negative Bacterial Resistance: An  
356 Update for the Practicing Clinician. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2015;90(3):395–403. Available  
357 from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2014.12.002>
- 358 7. Cheng G, Ning J, Ahmed S, Huang J, Ullah R, An B, et al. Selection and dissemination of  
359 antimicrobial resistance in Agri-food production. *Antimicrob Resist Infect Control*.  
360 2019;8(1):1–13.
- 361 8. Van Boeckel TP, Glennon EE, Chen D, Gilbert M, Robinson TP, Grenfell BT, et al. Reducing  
362 antimicrobial use in food animals. *Science* (80- ). 2017;357(6358):1350–2.
- 363 9. More SJ. European perspectives on efforts to reduce antimicrobial usage in food animal  
364 production. *Ir Vet J*. 2020;73(1):1–12.
- 365 10. Watkins RR, Bonomo RA. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance.

**Bacilos Gram-negativos multirresistentes isolados das mãos de trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil**

- 366 Infect Dis Clin North Am. 2016;30(2):313–22.
- 367 11. Hoelzer K, Wong N, Thomas J, Talkington K, Jungman E, Coukell A. Antimicrobial drug use  
368 in food-producing animals and associated human health risks: What, and how strong, is the  
369 evidence? BMC Vet Res. 2017;13(1):1–38.
- 370 12. Tang KL, Caffrey NP, Nóbrega DB, Cork SC, Ronksley PE, Barkema HW, et al. Articles  
371 Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic  
372 resistance in food-producing animals and human beings : a systematic review and meta-  
373 analysis. 2017;5196(17):9–11.
- 374 13. Bruker Daltonik. MALDI Biotyper. User manual. 2008;1(May):1–212.
- 375 14. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory  
376 Standards Institute; 2017.
- 377 15. Van Boeckel TP, Pires J, Silvester R, Zhao C, Song J, Criscuolo NG, et al. Global trends in  
378 antimicrobial resistance in animals in low- And middle-income countries. Science (80- ).  
379 2019;365(6459).
- 380 16. Dang STT, Bortolaia V, Tran NT, Le HQ, Dalsgaard A. Cephalosporin-resistant *Escherichia*  
381 *coli* isolated from farm workers and pigs in northern Vietnam. Trop Med Int Heal.  
382 2018;23(4):415–24.
- 383 17. Fischer J, Hille K, Mellmann A, Schaumburg F, Kreienbrock L, Köck R. Low-level  
384 antimicrobial resistance of Enterobacteriaceae isolated from the nares of pig-exposed persons.  
385 Epidemiol Infect. 2016;144(4):686–90.
- 386 18. Zhang H, Zhai Z, Li Q, Liu L, Guo S, Li Q. Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -  
387 Lactamase – Producing *Escherichia coli* Isolates from Pigs and Farm Workers.  
388 2016;79(9):1630–4.
- 389 19. Dohmen W, Bonten MJM, Bos MEH, van Marm S, Scharringa J, Wagenaar JA, et al. Carriage  
390 of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs. Clin  
391 Microbiol Infect [Internet]. 2015;21(10):917–23. Available from:  
392 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.05.032>
- 393 20. Moodley A, Guardabassi L. Transmission of IncN Plasmids Carrying *bla* CTX-M-1 between  
394 Commensal *Escherichia coli* in Pigs and Farm Workers □ †. 2009;53(4):1709–11.
- 395 21. Dahms C, Hubner NO, Kossow A, Mellmann A, Dittmann K, Kramer A. Occurrence of  
396 ESBL-producing *Escherichia coli* in livestock and farm workers in Mecklenburg-Western  
397 Pomerania, Germany. PLoS One. 2015;10(11):1–13.
- 398 22. Kraemer JG, Pires J, Kueffer M, Semaani E, Endimiani A, Hilty M, et al. Prevalence of  
399 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae and Methicillin-Resistant  
400 *Staphylococcus aureus* in pig farms in Switzerland. Sci Total Environ [Internet]. 2017;603–  
401 604:401–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.110>

**Bacilos Gram-negativos multirresistentes isolados das mãos de trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil**

- 402 23. Irrgang A, Pauly N, Tenhagen BA, Grobbel M, Kaesbohrer A, Hammerl JA. Spill-over from  
403 public health? First detection of an OXA-48-producing *Escherichia coli* in a German pig farm.  
404 *Microorganisms*. 2020;8(6):1–7.
- 405 24. Furlan JPR, Stehling EG. Detection of  $\beta$ -lactamase encoding genes in feces, soil and water  
406 from a Brazilian pig farm. *Environ Monit Assess*. 2018;190(2).
- 407 25. Büyükcım A, Tuncer Ö, Gür D, Sancak B, Ceyhan M, Cengiz AB, et al. Clinical and  
408 microbiological characteristics of *Pantoea agglomerans* infection in children. *J Infect Public*  
409 *Health*. 2018;11(3):304–9.
- 410 26. Siwakoti S, Sah R, Rajbhandari RS, Khanal B. *Pantoea agglomerans* Infections in Children:  
411 Report of Two Cases . *Case Rep Pediatr*. 2018;2018:1–3.
- 412 27. Sengupta M, Banerjee S, Das NK, Guchhait P, Misra S. Early onset Neonatal Septicaemia  
413 caused by *Pantoea agglomerans*. *J Clin Diagnostic Res*. 2016;10(5):DD01–2.
- 414 28. Yong J, Yan W, Zhu S, Guo C, Xia Y, Min Z, et al. A Comparative Study of Associated  
415 Microbiota Between Pig Farm and Pig Slaughterhouse in Guangdong , China. *Curr Microbiol*  
416 [Internet]. 2020;77(11):3310–20. Available from: [https://doi.org/10.1007/s00284-020-02187-](https://doi.org/10.1007/s00284-020-02187-w)  
417 [w](https://doi.org/10.1007/s00284-020-02187-w)
- 418 29. Leclercq SO, Wang C. A multiplayer game : species of *Clostridium* , *Acinetobacter* , and  
419 *Pseudomonas* are responsible for the persistence of antibiotic resistance genes in manure-  
420 treated soils. 2016;18:3494–508.
- 421 30. De Oliveira KMP, Julio PD dos S, Grisolia AB. Antimicrobial susceptibility profile of  
422 *Pseudomonas* spp. isolated from a swine slaughterhouse in Dourados, Mato Grosso do Sul  
423 State, Brazil. *Rev Argent Microbiol*. 2013;45(1):57–60.
- 424 31. Lupo A, Haenni M, Madec J. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and  
425 *Pseudomonas* spp. *Antimicrob Resist Bact from Lifest Companion Anim*. 2018;377–93.
- 426 32. Hrenovic J, Seruga Music M, Durn G, Dekic S, Hunjak B, Kisic I. Carbapenem-resistant  
427 *acinetobacter baumannii* recovered from swine manure. *Microb Drug Resist*. 2019;25(5):725–  
428 30.
- 429 33. Hsu L-Y, Apisarnthanarak A, Khan E, Suwantarant N, Ghafur A, Tambyah PA. Carbapenem-  
430 resistant *Acinetobacter baumannii* and Enterobacteriaceae in south and southeast Asia. *Clin*  
431 *Microbiol Rev*. 2017;30(1):1–22.
- 432 34. Lopes BS, Al-Agamy MH, Ismail MA, Shibl AM, Al-Qahtani AA, Al-Ahdal MN, et al. The  
433 transferability of *blaOXA-23* gene in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates  
434 from Saudi Arabia and Egypt. *Int J Med Microbiol*. 2015;305(6):581–8.
- 435 35. Hamouda A, Findlay J, Al Hassan L, Amyes SGB. Epidemiology of *Acinetobacter baumannii*  
436 of animal origin. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2011;38(4):314–8. Available from:  
437 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.06.007>

**Bacilos Gram-negativos multirresistentes isolados das mãos de trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil**

- 438 36. de Kraker MEA, Wolkewitz M, Davey PG, Koller W, Berger J, Nagler J, et al. Burden of  
439 antimicrobial resistance in European hospitals: Excess mortality and length of hospital stay  
440 associated with bloodstream infections due to *Escherichia coli* resistant to third-generation  
441 cephalosporins. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(2):398–407.
- 442 37. (BIOHAZ) EP on BH. Scientific Opinion on Carbapenem resistance in food animal  
443 ecosystems. *EFSA J.* 2013;11(12):3501.
- 444 38. Dandachi I, Chabou S, Daoud Z, Rolain JM. Prevalence and emergence of extended-spectrum  
445 cephalosporin-, carbapenem- and colistin-resistant gram negative bacteria of animal origin in  
446 the Mediterranean basin. *Front Microbiol.* 2018;9(September):1–26.
- 447

## 10. Material suplementar

**Tabela 1:** Número e percentual (%) de espécies identificadas por espectrometria de massas MALDI-TOF de bacilos Gram-negativos fermentadores e não fermentadores isolados das mãos de trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil

| Espécies identificadas                                 | Número e percentual (%) de isolados identificados |
|--|---|
| <b>Bacilos Gram-negativos fermentadores</b>            |   |
| <i>Citrobacter farmeri</i>                             | 1(1,5%)   |
| <i>Citrobacter freundii</i>                            | 1(1,5%)   |
| <i>Citrobacter koseri</i>                              | 1(1,5%)   |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>                          | 1(1,5%)   |
| <i>Enterobacter asburie</i>                            | 1(1,5%)   |
| <i>Enterobacter cloacae</i>                            | 5 (7,7%)  |
| <i>Escherichia vulneris</i>                            | 1(1,5%)   |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>                              | 6 (9,2%)  |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>                           | 9 (13,4%)   |
| <i>Klebsiella variicola</i>                            | 6 (9,2%)  |
| <i>Kluyvera cryocrescens</i>                           | 1(1,5%)   |
| <i>Leclercia adecarboxylata</i>                        | 2 (3%)  |
| <i>Lelliottia amnigena</i>                             | 1(1,5%)   |
| <i>Pantoea agglomerans</i>                             | 3 (4,6%)  |
| <i>Pantoea dispersa</i>                                | 1(1,5%)   |
| <i>Pantoea gaviniae</i>                                | 1(1,5%)   |
| <i>Pantoea septica</i>                                 | 2 (3%)  |
| <i>Serratia marcescens</i>                             | 1(1,5%)   |
| <i>Serratia rubidaea</i>                               | 1(1,5%)   |
| Total de isolados identificados                        | 45 (69,2%)  |
| <b>Bacilos Gram-negativos não fermentadores</b>        |   |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>                         | 12 (18,5%)  |
| <i>Acinetobacter baylyi</i>                            | 1(1,5%)   |
| <i>Acinetobacter ursingii</i>                          | 1(1,5%)   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                          | 1(1,5%)   |
| <i>Pseudomonas fulva</i>                               | 1(1,5%)   |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i>                            | 3(4,6%)   |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>                    | 1 (1,5%)  |
| Total de isolados identificados                        | 20 (30,8%)  |
| Isolados não identificados a nível de gênero e espécie | 2 (3%)  |
| Total  | 67 (100%)   |

**Tabela 2:** Perfil de suscetibilidade de bacilos Gram-negativos isolados das mãos de trabalhadores de fazendas de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil

| Espécies                              | AMC30            | PIT110          | FEP30            | CTX30            | CAZ30            | CRO30            | EFT30            | IMI10            | MEM10            | CIP5             | SXT25           | AK30             | CN10             | TET30            | ESBL             |
|---------------------------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <i>Citrobacter freundii</i> (n=1)     | RI (n=1)<br>100% | NT              | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | NT               | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | NT               | R (n=1)<br>100% | NT               | S (n=1)<br>100%  | R (n=1)<br>100%  | N (n=1)<br>100%  |
| <i>Citrobacter koseri</i> (n=1)       | S (n=1)<br>100%  | NT              | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | R (n=1)<br>100%  | NT               | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | NT               | S (n=1)<br>100% | NT               | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | N (n=1)<br>100%  |
| <i>Enterobacter asburiae</i> (n=1)    | S (n=1)<br>100%  | NT              | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | NT               | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | NT               | R (n=1)<br>100% | NT               | S (n=1)<br>100%  | R (n=1)<br>100%  | N (n=1)<br>100%  |
| <i>Enterobacter cloacae</i> (n=3)     | RI (n=3)<br>100% | NT              | S (n=3)<br>100%  | R (n=1)<br>33,3% | R (n=1)<br>33,3% | NT               | S (n=3)<br>100%  | S (n=3)<br>100%  | S (n=3)<br>100%  | NT               | S (n=3)<br>100% | NT               | S (n=3)<br>100%  | R (n=2)<br>66,6% | N (n=3)<br>100%  |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> (n=2)       | S (n=2)<br>100%  | NT              | S (n=2)<br>100%  | S (n=2)<br>100%  | S (n=2)<br>100%  | NT               | S (n=2)<br>100%  | S (n=2)<br>100%  | S (n=2)<br>100%  | NT               | R (n=2)<br>100% | NT               | S (n=2)<br>100%  | R (n=2)<br>100%  | N (n=2)<br>100%  |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=3)    | I (n=1)<br>33,3% | NT              | I (n=2)<br>66,6% | I (n=1)<br>33,3% | S (n=3)<br>100%  | NT               | I (n=2)<br>50%   | I (n=3)<br>100%  | I (n=3)<br>100%  | NT               | S (n=3)<br>100% | NT               | S (n=3)<br>100%  | R (n=1)<br>33,3% | N (n=3)<br>100%  |
| <i>Klebsiella variicola</i> (n=4)     | R (n=2)<br>50%   | NT              | S (n=4)<br>100%  | S (n=4)<br>100%  | S (n=4)<br>100%  | NT               | R (n=1)<br>25%   | I (n=1)<br>25%   | I (n=1)<br>25%   | NT               | S (n=4)<br>100% | NT               | S (n=4)<br>100%  | R (n=1)<br>25%   | N (n=4)<br>100%  |
| <i>*Pantoea agglomerans</i> (n=3)     | S (n=3)<br>100%  | NT              | R (n=2)<br>66,6% | R (n=2)<br>66,6% | R (n=2)<br>66,6% | NT               | R (n=1)<br>33,3% | I (n=2)<br>66,6% | R (n=2)<br>66,6% | NT               | S (n=3)<br>100% | NT               | R (n=1)<br>33,3% | R (n=1)<br>33,3% | P (n=2)<br>66,6% |
| <i>Serratia marcescens</i> (n=1)      | RI (n=1)         | NT              | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | NT               | S (n=1)<br>100%  | I (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | NT               | S (n=1)<br>100% | NT               | S (n=1)<br>100%  | I (n=1)<br>100%  | N (n=1)<br>100%  |
| <i>Serratia rubidaea</i> (n=1)        | S (n=1)<br>100%  | NT              | S (n=1)<br>100%  | I (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | NT               | I (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | NT               | I (n=1)<br>100% | NT               | S (n=1)<br>100%  | I (n=1)<br>100%  | N (n=1)<br>100%  |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> (n=12) | NP               | I (n=1)<br>8,3% | S (n=12)<br>100% | NT               | I (n=2)<br>16,6% | I (n=12)<br>100% | NT               | I (n=1)<br>8,3%  | S (n=12)<br>100% | S (n=12)<br>100% | I (n=1)<br>8,3% | S (n=12)<br>100% | S (n=12)<br>100% | S (n=12)<br>100% | N (n=12)<br>100% |
| <i>Acinetobacter ursingii</i> (n=1)   | NP               | S (n=1)<br>100% | S (n=1)<br>100%  | NT               | R (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | NT               | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | I (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100% | I (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | NP               |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=1)   | NP               | S (n=1)<br>100% | S (n=1)<br>100%  | NP               | S (n=1)<br>100%  | NP               | NT               | I (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | NP              | S (n=1)<br>100%  | S (n=1)<br>100%  | NP               | NP               |

Perfil de suscetibilidade apresentado como número (n) e porcentagem (%). S, sensível; I, intermediário; R, resistente; RI, resistência intrínseca. Antimicrobianos testados: AMC30, amoxicilina-ácido clavulânico; PIT110, piperacilina-tazobactam; FEP30, cefepima; CTX30, cefotaxima; CAZ30, ceftazidima; CRO30, ceftriaxona; EFT30, ceftiofur; IMP10, imipenem; MEM10, meropenem; CIP5, ciprofloxacina; SXT25, sulfametoxazol-trimetoprim; AK30, ampicilina; CN10, gentamicina; TET30, tetraciclina; ESBL, beta-lactamases de espectro estendido. N, negativo; P, positivo; NT, não testado; NP, não padronizado pelo CLSI para o microrganismo testado. \* O teste dos isolados de *Pantoea agglomerans* foi baseado na interpretação do grupo Enterobacteriaceae do CLSI.

### 3 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste estudo foi possível identificar os isolados de bacilos Gram-negativos e o perfil de suscetibilidade de amostras provenientes das mãos de trabalhadores de suinocultura no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Com base nessa análise foi possível identificar isolados de importância clínica como BGNs não fermentadores, como *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Enterobacteriaceae* resistentes a cefalosporinas de terceira geração, carbapenêmicos e outros grupos de antimicrobianos, como penicilina associada a inibidores de  $\beta$ -lactamase, folato, aminoglicosídeo e tetraciclina. Além disso, foram identificados dois isolados de *Pantoea agglomerans*, uma espécie ambiental patogênica oportunista, com perfil de multirresistência e produtora de ESBL. De acordo com os dados presentes na literatura, a transmissão de BGNs carreadores de genes de resistência de suínos para trabalhadores de suinocultura é amplamente disseminada. Entretanto, somente algumas evidências demonstram a disseminação da resistência presente na cadeia de produção animal para o ambiente hospitalar. Por isso, mais estudos são necessários para aprofundar a compreensão do modo pelo qual essas bactérias resistentes alcançam o ambiente hospitalar.

Considerando o conhecimento ainda limitado em relação a transferência de determinantes da resistência a antimicrobianos de fontes de origem animal para a clínica surge a necessidade de se conhecer melhor a dinâmica do perfil de resistência deste reservatório ambiental para se monitorar a ocorrência de bactérias resistentes, e assim contribuir para a formulação de medidas que busquem mitigar a sua propagação em potencial. Novos estudos além de identificar o perfil de suscetibilidade e perfil fenotípico da presença de ESBLs da microbiota das mãos dos trabalhadores, podem também identificar genes de resistência a  $\beta$ -lactamases (como por exemplo *bla<sub>CTX</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>* e AmpC), caracterizar plasmídeos carreadores de resistência e analisar a possível clonalidade entre isolados, buscando traçar um panorama da disseminação da resistência presentes cadeia de produção de suinocultura. Como perspectivas futuras, trabalhos como esse contribuem para auxiliar na formulação de políticas de monitoramento e vigilância por parte dos órgãos fiscalizadores e de saúde pública.

## REFERÊNCIAS

1. Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Qualidade da carne suína [Internet]. 2020 [cited 2020 Aug 12]. Available from: <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-su>
2. ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. Carne Suína [Internet]. Relatório Anual. São Paulo, SP; 2019. Available from: <http://abpa-br.org/mercados/>
3. Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Suínos e Aves [Internet]. 2020. Available from: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/mapas>
4. USDA - United States Department of Agriculture. Livestock and poultry: world markets and trade [Internet]. United States Department of Agriculture. 2020 [cited 2020 Aug 12]. Available from: [https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock\\_poultry.pdf](https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf)
5. WHO - World Health Organization. International partnership to address human-animal-environment health risks gets a boost. [Internet]. World Health Organization. 2018 [cited 2020 Mar 3]. Available from: <https://www.who.int/news-room/detail/30-05-2018-international-partnership-to-address-human-animal-environment-health-risks-gets-a-boost>
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR). 2018; Available from: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos/arquivos/copy\\_of\\_PANBRdez2018.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos/arquivos/copy_of_PANBRdez2018.pdf)
7. Brasil. Ministério da Agricultura P e AS de DAC sobre P da R aos A em A. Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da Agropecuária (Pan-Br Agro). 2018; Available from: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos/arquivos/PANBRAGROv.1.0maio2018.pdf>
8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da Agropecuária, o PAN-BR AGRO [Internet]. [cited 2020 Aug 12]. Available from: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos/pan-br-agro>
9. Brasil. Instrução normativa nº 41, de 23 de outubro de 2017. Diário Oficial da União [Internet]. 2017; Available from: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos/arquivos/in-41-2017-agroprevine.pdf>

10. Brasil. Ministério da Agricultura P e A. Suínos [Internet]. [cited 2020 Aug 12]. Available from: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/boas-praticas-e-bem-estar-animal/suinos>
11. Magouras I, Carmo LP, Stärk KDC, Schüpbach-Regula G. Antimicrobial usage and -resistance in livestock: Where should we focus? *Front Vet Sci.* 2017;4(SEP):1–4.
12. Gaynes R. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(5):849.
13. Lekshmi M, Ammini P, Kumar S, Varela MF. The Food Production Environment and the Development of Antimicrobial Resistance in Human Pathogens of Animal Origin. *Microorganisms.* 2017;5(1):11.
14. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence Mech Bact Pathog.* 2016;481–511.
15. McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: A One Health Colloquium. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2017;6(2):1–26. Available from: [www.chathamhouse.org](http://www.chathamhouse.org)
16. Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet.* 2016;387(10014):176–87.
17. Hoelzer K, Wong N, Thomas J, Talkington K, Jungman E, Coukell A. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: What, and how strong, is the evidence? *BMC Vet Res.* 2017;13(1):1–38.
18. Collignon PJ, McEwen SA. One health-its importance in helping to better control antimicrobial resistance. *Trop Med Infect Dis.* 2019;4(1):22.
19. Perry J, Waglechner N, Wright G. The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(6): a025197.
20. Cheng G, Ning J, Ahmed S, Huang J, Ullah R, An B, et al. Selection and dissemination of antimicrobial resistance in Agri-food production. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8(1):1–13.
21. Xiong W, Sun Y, Zeng Z. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. *Environ Sci Pollut Res.* 2018;25(19):18377–84.
22. Hao H, Cheng G, Iqbal Z, Ai X, Hussain HI, Huang L. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. 2014;5(June):1–11.
23. Van Boeckel TP, Glennon EE, Chen D, Gilbert M, Robinson TP, Grenfell BT, et al. Reducing antimicrobial use in food animals. *Science (80- ).* 2017;357(6358):1350–2.
24. Van Boeckel TP, Pires J, Silvester R, Zhao C, Song J, Criscuolo NG, et al. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- And middle-income countries. *Science.* 2019;365(6459): eaaw1944.
25. Lagha A Ben, Haas B, Gottschalk M, Grenier D. Antimicrobial potential of

- bacteriocins in poultry and swine production. *Vet Res.* 2017;1–12.
26. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(18):5649–54.
  27. Fairbrother JM, Nadeau É, Gyles CL. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Heal Res Rev.* 2005;6(1):17.
  28. Reis J, Zanella C, Morés N, Santos E, Barcellos N De. Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. 2016;(1):443–53.
  29. Luppi A. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porc Heal Manag.* 2017;3(1):16.
  30. Kich JD, Meneguzzi M, Reichen C. Salmonelose clínica em suínos no Brasil? diagnóstico e controle. In: Embrapa Suínos e Aves. In: Simpósio Internacional de Suinocultura, 10., 2017, Porto Alegre. *Avanços ...*; 2017.
  31. Lima AL, Rodrigues DP, Araújo MS, Reis EMF, Festivo ML, Rodrigues ECP, et al. Sorovares e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em *Salmonella* spp. isoladas de produtos de origem suína. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec.* 2016;68(1):39–47.
  32. Barton MD. Impact of antibiotic use in the swine industry. *Curr Opin Microbiol.* 2014;19:9–15.
  33. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318–27.
  34. WHO - World Health Organization. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. World Health Organization; 2017.
  35. Vasoo S, Barreto JN, Tosh PK. Emerging Issues in Gram-Negative Bacterial Resistance: An Update for the Practicing Clinician. *Mayo Clin Proc [Internet].* 2015;90(3):395–403. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2014.12.002>
  36. Mukerji S, O’Dea M, Barton M, Kirkwood R, Lee T, Abraham S. Development and transmission of antimicrobial resistance among Gram-negative bacteria in animals and their public health impact. *Essays Biochem.* 2017;61(1):23–35.
  37. Bonomo RA.  $\beta$ -Lactamases: a focus on current challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(1):a025239.
  38. Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, Endimiani A. Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? *Drug Resist Updat [Internet].* 2013;16(1–2):22–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drup.2012.12.001>
  39. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Módulo 3: Gram-negativos -

- resistência aos antimicrobianos [Internet]. Resistência microbiana - Mecanismos e impacto clínico. 2007. Available from: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo3/gramn\\_lacta3.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramn_lacta3.htm)
40. Nguyen NQ, Krishnan NP, Rojas LJ, Prati F, Caselli E, Romagnoli C, et al. Crystal structures of KPC-2 and SHV-1  $\beta$ -lactamases in complex with the boronic acid transition state analog S02030. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(3):1760–6.
  41. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis.* 2019;69(Supplement\_7):S521–8.
  42. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med.* 2012;18(5):263–72.
  43. Marshall S, Hujer AM, Rojas LJ, Papp-Wallace KM, Humphries RM, Spellberg B, et al. Can ceftazidime-avibactam and aztreonam overcome  $\beta$ -lactam resistance conferred by metallo- $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae? *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(4):e02243-16.
  44. Ruppé É, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care.* 2015;5(1):21.
  45. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, et al.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors in the 21st century. *J Mol Biol.* 2019;431(18):3472–500.
  46. Leonard DA, Bonomo RA, Powers RA. Class D  $\beta$ -lactamases: a reappraisal after five decades. *Acc Chem Res.* 2013;46(11):2407–15.
  47. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):5873–84.
  48. El Salabi A, Walsh TR, Chouchani C. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 2013;39(2):113–22.
  49. Walsh TR. Emerging carbapenemases: A global perspective. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2010;36(SUPPL. 3):S8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579\(10\)70004-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(10)70004-2)
  50. Wilson H, Török ME. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microb Genomics.* 2018;4(7).
  51. Kazmierczak KM, Rabine S, Hackel M, McLaughlin RE, Biedenbach DJ, Bouchillon SK, et al. Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo- $\beta$ -lactamase-producing enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(2):1067–78.
  52. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49(5):526–35.

53. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):161–8.
54. Poirel L, Kieffer N, Liassine N, Thanh D, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(3):281.
55. Martínez JL, Coque TM, Baquero F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(2):116–23.
56. More SJ. European perspectives on efforts to reduce antimicrobial usage in food animal production. *Ir Vet J*. 2020;73(1):1–12.
57. Zhang H, Zhai Z, Li Q, Liu L, Guo S, Li Q. Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase – Producing *Escherichia coli* Isolates from Pigs and Farm Workers. 2016;79(9):1630–4.
58. Dahms C, Hubner NO, Kossow A, Mellmann A, Dittmann K, Kramer A. Occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* in livestock and farm workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *PLoS One*. 2015;10(11):1–13.
59. Moodley A, Guardabassi L. Transmission of IncN Plasmids Carrying *bla* CTX-M-1 between Commensal *Escherichia coli* in Pigs and Farm Workers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(4):1709–11.
60. Dohmen W, Bonten MJM, Bos MEH, van Marm S, Scharringa J, Wagenaar JA, et al. Carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2015;21(10):917–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.05.032>

**APÊNDICE A – TABELA DE IDENTIFICAÇÃO DOS BACIOS GRAM-NEGATIVOS  
ISOLADOS DAS MÃOS DOS TRABALHADORES DE GRANJAS DE  
SUINOCULTURA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

| <b>Id Amostra</b> | <b>Lote</b> | <b>ID Lote</b> | <b>Espécie</b>                      | <b>Data Coleta</b> | <b>Data do isolamento</b> | <b>Data de identificação no Maldi-TOF</b> | <b>Escore de identificação no Maldi-TOF</b> |
|-------------------|-------------|----------------|-------------------------------------|--------------------|---------------------------|---|---|
| 1198              | 46          | H46.3          | <i>Citrobacter freundii</i>         | 11.09.2018         | 14.09.2018                | 07.11.2019                                | 2.515                                       |
| 1070              | 39          | H39.2          | <i>Citrobacter koseri</i>           | 14.08.2018         | 16.08.2018                | 04.09.2018                                | 2.393                                       |
| 975               | 28          | H28.1          | <i>Enterobacter aerogenes</i>       | 31.07.2018         | 02.08.2018                | 04.09.2018                                | 2.494                                       |
| 769               | 18          | H18.2          | <i>Enterobacter asburiae</i>        | 13.06.2018         | 15.06.2018                | 07.11.2019                                | 2.332                                       |
| 620               | 8           | H8.2           | <i>Enterobacter cloacae</i>         | 03.04.2018         | 05.04.2018                | 17.04.2018                                | 2.267                                       |
| 686               | 11          | H11.1          | <i>Enterobacter cloacae</i>         | 16.05.2018         | 18.05.2018                | 05.11.2019                                | 2.164                                       |
| 688               | 11          | H11.2          | <i>Enterobacter cloacae</i>         | 16.05.2018         | 18.05.2018                | 07.06.2018                                | 2.366                                       |
| 691               | 13          | H13.1          | <i>Enterobacter cloacae</i>         | 16.05.2018         | 18.05.2018                | 07.06.2018                                | 2.362                                       |
| 770               | 19          | H19.1          | <i>Enterobacter cloacae</i>         | 13.06.2018         | 15.06.2018                | 07.11.2019                                | 2.512                                       |
| 976               | 29          | H29.1          | <i>Escherichia vulneris</i>         | 31.07.2018         | 02.08.2018                | 31.01.2020                                | 1.870                                       |
| 742               | 11          | H11.2          | <i>Klebsiella oxytoca</i>           | 16.05.2018         | 20.05.2018                | 26.06.2018                                | 2.483                                       |
| 991               | 28          | H28.1          | <i>Klebsiella oxytoca</i>           | 31.07.2018         | 03.08.2018                | 04.10.2018                                | 2.272                                       |
| 617               | 5           | H5             | <i>Klebsiella pneumoniae</i>        | 03.04.2018         | 05.04.2018                | 13.11.2019                                | 2.480                                       |
| 618               | 6           | H6             | <i>Klebsiella pneumoniae</i>        | 03.04.2018         | 05.04.2018                | 11.05.2019                                | 2.337                                       |
| 886               | 21          | H21.2          | <i>Klebsiella pneumoniae</i>        | 10.07.2018         | 12.07.2018                | 23.08.2018                                | 2.378                                       |
| 684               | 10          | H10.2          | <i>Klebsiella variicola</i>         | 16.05.2018         | 18.05.2018                | 07.06.2018                                | 2.406                                       |
| 690               | 12          | H12.3          | <i>Klebsiella variicola</i>         | 16.05.2018         | 18.05.2018                | 26.06.2018                                | 2.365                                       |
| 694               | 12          | H12.2          | <i>Klebsiella variicola</i>         | 16.05.2018         | 18.05.2018                | 07.06.2018                                | 2.139                                       |
| 762               | 14          | H14            | <i>Klebsiella variicola</i>         | 13.06.2018         | 15.06.2018                | 05.07.2018                                | 2.478                                       |
| 982               | 33          | H33.1          | <i>Pantoea agglomerans</i>          | 31.07.2018         | 02.08.2018                | 31.01.2020                                | 2.000                                       |
| 1063              | 34          | H34.1          | <i>Pantoea agglomerans</i>          | 14.08.2018         | 16.08.2018                | 27.09.2018                                | 2.246                                       |
| 1071              | 40          | H40.1          | <i>Pantoea agglomerans</i>          | 14.08.2018         | 16.08.2018                | 27.09.2018                                | 2.129                                       |
| 1069              | 39          | H39.1          | <i>Pantoea septica</i>              | 14.08.2018         | 16.08.2018                | 04.09.2018                                | 2.463                                       |
| 1124              | 46          | H46.3          | <i>Serratia marcescens</i>          | 11.09.2018         | 13.09.2018                | 09.10.2018                                | 2.386                                       |
| 1064              | 34          | H34.2          | <i>Serratia rubidaea</i>            | 14.08.2018         | 16.08.2018                | 09.10.2018                                | 2.234                                       |
| 1068              | 37          | H37.1          | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 14.08.2018         | 16.08.2018                | 04.09.2018                                | 2.222                                       |
| 687               | 11          | H11.1          | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | 16.05.2018         | 18.05.2018                | 07.06.2018                                | 2.299                                       |
| 884               | 20          | H20.1          | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | 10.07.2018         | 12.07.2018                | 07.11.2019                                | 2.308                                       |
| 885               | 21          | H21.1          | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | 10.07.2018         | 12.07.2018                | 07.11.2019                                | 2.289                                       |
| 893               | 26          | H26.1          | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | 10.07.2018         | 12.07.2018                | 23.08.2018                                | 2.402                                       |
| 894               | 21          | H21.2          | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | 10.07.2018         | 12.07.2018                | 23.08.2018                                | 2.503                                       |
| 895               | 21          | H21.2          | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | 10.07.2018         | 12.07.2018                | 05.11.2019                                | 2.492                                       |
| 974               | 28          | H28.1          | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | 31.07.2018         | 02.08.2018                | 04.09.2018                                | 2.308                                       |
| 980               | 32          | H32.1          | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | 31.07.2018         | 02.08.2018                | 04.09.2018                                | 2.346                                       |

Continua

| <b>Id Amostra</b> | <b>Lote</b> | <b>ID Lote</b> | <b>Espécie</b>                 | <b>Data Coleta</b> | <b>Data do isolamento</b> | <b>Data de identificação no Maldi-TOF</b> | <b>Escore de identificação no Maldi-TOF</b> |
|-------------------|-------------|----------------|--------------------------------|--------------------|---------------------------|---|---|
| 1062              | 34          | H34.1          | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 14.08.2018         | 16.08.2018                | 04.09.2018                                | 2.398                                       |
| 1066              | 35          | H35.2          | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 14.08.2018         | 16.08.2018                | 04.10.2018                                | 2.203                                       |
| 1121              | 45          | H45            | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 11.09.2018         | 13.09.2018                | 27.09.2018                                | 2.316                                       |
| 1195              | 42          | H42.2          | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 11.09.2018         | 14.09.2018                | 27.09.2018                                | 2.297                                       |
| 695               | 10          | H10.2          | <i>Acinetobacter baylyi</i>    | 16.05.2018         | 18.05.2018                | 07.06.2018                                | 1.877                                       |
| 1065              | 35          | H35.1          | <i>Acinetobacter ursingii</i>  | 14.08.2018         | 16.08.2018                | 04.09.2018                                | 2.500                                       |
| 1193              | 44          | H44            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | 11.09.2018         | 14.09.2018                | 27.09.2018                                | 2.527                                       |
| 683               | 10          | H10.1          | <i>Pseudomonas fulva</i>       | 16.05.2018         | 18.05.2018                | 07.06.2018                                | 2.216                                       |
| 973               | 27          | H27.1          | <i>Pseudomonas stutzeri</i>    | 31.07.2018         | 02.08.2018                | 04.09.2018                                | 2.186                                       |
| 978               | 29          | H29.4          | <i>Pseudomonas stutzeri</i>    | 31.07.2018         | 02.08.2018                | 04.09.2018                                | 2.209                                       |
| 979               | 30          | H30.1          | <i>Pseudomonas stutzeri</i>    | 31.07.2018         | 02.08.2018                | 04.09.2018                                | 2.377                                       |

**APÊNDICE B – TABELA DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DOS BACIOS GRAM-NEGATIVOS ISOLADOS DAS MÃOS DOS TRABALHADORES DE GRANJAS DE SUINOCULTURA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

| Id   | Espécie                       | MEM | IMI | CAZ | FEP | CN | TET | SXT | AMC | CTX | EFT | ENR | PIT | CIP | AK | APS | CRO | ATM | TOB | TIC | LEV | ESBL |
|------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 1198 | <i>Citrobacter freundii</i>   | S   | S   | S   | S   | S  | R   | R   | RI  | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 1070 | <i>Citrobacter koseri</i>     | S   | S   | R   | S   | S  | S   | S   | S   | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 975  | <i>Enterobacter aerogenes</i> | S   | S   | S   | S   | S  | S   | S   | RI  | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 769  | <i>Enterobacter asburiae</i>  | S   | S   | S   | S   | S  | R   | R   | S   | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 620  | <i>Enterobacter cloacae</i>   | S   | S   | S   | S   | S  | R   | S   | RI  | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 686  | <i>Enterobacter cloacae</i>   | S   | S   | R   | S   | S  | S   | S   | RI  | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 688  | <i>Enterobacter cloacae</i>   | S   | S   | S   | S   | S  | R   | S   | RI  | R   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 691  | <i>Enterobacter cloacae</i>   | S   | S   | S   | S   | S  | S   | S   | RI  | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 770  | <i>Enterobacter cloacae</i>   | S   | S   | S   | S   | S  | S   | S   | RI  | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 976  | <i>Escherichia vulneris</i>   | S   | S   | S   | S   | S  | S   | S   | S   | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 742  | <i>Klebsiella oxytoca</i>     | S   | S   | S   | S   | S  | R   | R   | S   | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 991  | <i>Klebsiella oxytoca</i>     | S   | S   | S   | S   | S  | R   | R   | S   | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 617  | <i>Klebsiella pneumoniae</i>  | I   | I   | S   | I   | S  | R   | S   | I   | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 618  | <i>Klebsiella pneumoniae</i>  | I   | I   | S   | I   | S  | S   | S   | S   | I   | I   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 886  | <i>Klebsiella pneumoniae</i>  | I   | I   | S   | S   | S  | S   | S   | S   | S   | I   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 684  | <i>Klebsiella variicola</i>   | I   | I   | S   | S   | S  | S   | S   | S   | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 690  | <i>Klebsiella variicola</i>   | S   | S   | S   | S   | S  | S   | S   | R   | S   | R   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 694  | <i>Klebsiella variicola</i>   | S   | S   | S   | S   | S  | S   | S   | R   | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 762  | <i>Klebsiella variicola</i>   | S   | S   | S   | S   | S  | R   | S   | S   | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |
| 982  | <i>Pantoea agglomerans</i>    | R   | I   | R   | R   | I  | R   | S   | S   | R   | R   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | P    |
| 1063 | <i>Pantoea agglomerans</i>    | S   | S   | S   | S   | S  | S   | S   | S   | S   | S   | NP  | NT  | NT  | NT | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | NT  | N    |

Continua

| <b>Id</b> | <b>Espécie</b>                      | <b>MEM</b> | <b>IMI</b> | <b>CAZ</b> | <b>FEP</b> | <b>CN</b> | <b>TET</b> | <b>SXT</b> | <b>AMC</b> | <b>CTX</b> | <b>EFT</b> | <b>ENR</b> | <b>PIT</b> | <b>CIP</b> | <b>AK</b> | <b>APS</b> | <b>CRO</b> | <b>ATM</b> | <b>TOB</b> | <b>TIC</b> | <b>LEV</b> | <b>ESBL</b> |
|-----------|-------------------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| 1071      | <i>Pantoea agglomerans</i>          | R          | S          | R          | R          | R         | S          | S          | S          | R          | I          | NP         | NT         | NT         | NT        | NT         | NT         | NT         | NT         | NT         | NT         | P           |
| 1069      | <i>Pantoea septica</i>              | S          | S          | S          | S          | S         | S          | S          | S          | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NT        | NT         | NT         | NT         | NT         | NT         | NT         | N           |
| 1124      | <i>Serratia marcescens</i>          | S          | I          | S          | S          | S         | I          | S          | RI         | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NT        | NT         | NT         | NT         | NT         | NT         | NT         | N           |
| 1064      | <i>Serratia rubidaea</i>            | S          | S          | S          | S          | S         | I          | I          | S          | I          | I          | NP         | NT         | NT         | NT        | NT         | NT         | NT         | NT         | NT         | NT         | N           |
| 1068      | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | NP         | NP         | NP         | NP         | NP        | NP         | S          | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP        | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP          |
| 687       | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | S          | S          | S          | S          | S         | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NP         | S          | S          | S         | S          | I          | NP         | NT         | NT         | NT         | NP          |
| 884       | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | S          | S          | S          | S          | S         | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NP         | S          | S          | S         | S          | I          | NP         | NT         | NT         | NT         | NP          |
| 885       | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | S          | I          | S          | S          | S         | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NP         | S          | S          | S         | S          | I          | NP         | NT         | NT         | NT         | NP          |
| 893       | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | S          | S          | S          | S          | S         | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NP         | S          | S          | S         | S          | I          | NP         | NT         | NT         | NT         | NP          |
| 894       | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | S          | S          | S          | S          | S         | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NP         | S          | S          | S         | S          | I          | NP         | NT         | NT         | NT         | NP          |
| 895       | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | S          | S          | S          | S          | S         | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NP         | S          | S          | S         | S          | I          | NP         | NT         | NT         | NT         | NP          |
| 974       | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | S          | S          | S          | S          | S         | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NP         | S          | S          | S         | S          | I          | NP         | NT         | NT         | NT         | NP          |
| 980       | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | S          | S          | S          | S          | S         | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NP         | S          | S          | S         | S          | I          | NP         | NT         | NT         | NT         | NP          |
| 1062      | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | S          | S          | I          | S          | S         | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NP         | S          | S          | S         | S          | I          | NP         | NT         | NT         | NT         | NP          |
| 1066      | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | S          | S          | S          | S          | S         | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NP         | S          | S          | S         | S          | I          | NP         | NT         | NT         | NT         | NP          |
| 1121      | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | S          | S          | I          | S          | S         | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NP         | S          | S          | S         | S          | I          | NP         | NT         | NT         | NT         | NP          |
| 1195      | <i>Acinetobacter baumannii</i>      | S          | S          | S          | S          | S         | S          | I          | NP         | NT         | NT         | NP         | I          | S          | S         | S          | I          | NP         | NT         | NT         | NT         | NP          |
| 695       | <i>Acinetobacter baylyi</i>         | S          | S          | S          | S          | S         | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NP         | S          | S          | S         | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NT         | NP          |
| 1065      | <i>Acinetobacter ursingii</i>       | S          | S          | R          | S          | S         | S          | S          | NP         | NT         | NT         | NP         | S          | I          | I         | S          | S          | NT         | NT         | NT         | NT         | NP          |
| 1193      | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       | S          | I          | S          | S          | S         | NP         | NP         | NP         | NP         | NT         | NP         | S          | S          | S         | NP         | NP         | I          | S          | S          | S          | NP          |
| 683       | <i>Pseudomonas fulva</i>            | NP         | NP         | NP         | NP         | NP        | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP        | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP          |
| 973       | <i>Pseudomonas stutzeri</i>         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP        | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP        | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP          |
| 978       | <i>Pseudomonas stutzeri</i>         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP        | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP        | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP          |
| 979       | <i>Pseudomonas stutzeri</i>         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP        | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP        | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP         | NP          |

Perfil de suscetibilidade apresentado como S, sensível; I, intermediário; R, resistente; RI, resistência intrínseca, N, negativo; P, positivo; NT, não testado; NP, não padronizado pelo CLSI para o microrganismo testado. Antimicrobianos testados: IMP, imipinem; MEM, meropenem; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; CN, gentamicina; TET, tetraciclina; SXT, sulfametoxazol-trimetoprim; AMC, amoxicilina-ácido clavulânico; CTX, cefotaxima; EFT, ceftiofur; PIT, piperacilina-tazobactam; CIP, ciprofloxacina; AK, ampicilina; APS, ampicilina-sulbactam; CRO, ceftriaxona; ATM, aztreonam; TOB, tobramicina; TIC, ticarcilina; LEV, levofloxacina; ESBL, beta-lactamases de espectro estendido.

# ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA FRONTIERS IN MICROBIOLOGY

## Manuscript Formatting Guidelines

1. General standards
  - 1.1. Article Type
  - 1.2. Templates
  - 1.3. Manuscript Length
  - 1.4. Language Editing
  - 1.5. Language Style
  - 1.6. Search Engine Optimization (SEO)
  - 1.7. CrossMark Policy
  - 1.8. Title
  - 1.9. Authors and Affiliations
  - 1.10. Consortium/Group and Collaborative Authors
  - 1.11. Abstract
  - 1.12. Keywords
  - 1.13. Text
  - 1.14. Nomenclature
  - 1.15. Sections
  - 1.16. Acknowledgments
  - 1.17. Contribution to the Field Statement
2. Figure and Table Guidelines
  - 2.1. CC-BY Licence
  - 2.2. Figure Requirements and Style Guidelines
    - 2.2.1. Captions
    - 2.2.2. Image Size and Resolution Requirements
    - 2.2.3. Format and Color Image Mode
    - 2.2.4. Chemical Structures
  - 2.3. Table Requirements and Style Guidelines
  - 2.4. Accessibility
3. Supplementary Material
4. References
  - 4.1. Science, Engineering and Humanities Journals
    - 4.1.1. In-text Citations
    - 4.1.2. Reference List
    - 4.1.3. Resources
  - 4.2. Health, Physics, and Mathematics Journals
    - 4.2.1. In-text Citations
    - 4.2.2. Reference List

### 4.2.3. Resources

#### 1. General standards

##### 1.1. Article Type

Frontiers requires authors to carefully select the appropriate article type for their manuscript and to comply with the article type descriptions defined in the journal's "Article Types" page, which can be seen from the "For Authors" menu on any Frontiers journal page. Please pay close attention to the word count limits.

##### 1.2. Templates

If working with Word please use our Frontiers Word templates. If you wish to submit your article as LaTeX, we recommend our Frontiers LaTeX templates.

For LaTeX files, please ensure all relevant manuscript files are uploaded: .tex file, PDF, and .bib file (if the bibliography is not already included in the .tex file).

During the Interactive Review, authors are encouraged to upload versions using "Track Changes." Editors and reviewers can only download the PDF file of the submitted manuscript.

##### 1.3. Manuscript Length

Frontiers encourages the authors to closely follow the article word count lengths given in the "Article Types" page of the journals. The manuscript length includes only the main body of the text, footnotes, and all citations within it, and excludes the abstract, section titles, figure and table captions, funding statement, acknowledgments, and references in the bibliography. Please indicate the number of words and the number of figures and tables included in your manuscript on the first page.

##### 1.4. Language Editing

Frontiers requires manuscripts submitted to meet international English language standards to be considered for publication.

For authors who would like their manuscript to receive language editing or proofreading to improve the clarity of the manuscript and help highlight their research, Frontiers recommends the language-editing services provided by the following external partners:

##### Editage

Frontiers is pleased to recommend the language-editing service provided by our external partner Editage to authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing. These services may be particularly useful for researchers for whom English is not the primary language. They can help to improve the grammar, syntax, and flow of your manuscript prior to submission. Frontiers authors will receive a 10% discount by visiting the following link: <https://editage.com/frontiers/>.

## The Charlesworth Group

Frontiers recommends the Charlesworth Group's author services, who has a long-standing track record in language editing and proofreading. This is a third-party service for which Frontiers authors will receive a 10% discount by visiting the following link:

<https://www.cwauthors.com/frontiers/>.

Frontiers推荐您使用在英语语言编辑和校对领域具有悠久历史和良好口碑的查尔斯沃思作者服务。此项服务由第三方为您提供，Frontiers中国作者通过此链接提交稿件时可获得10%的特别优惠：[www.cwauthors.com.cn/frontiers/](http://www.cwauthors.com.cn/frontiers/)。

Note that sending your manuscript for language editing does not imply or guarantee that it will be accepted for publication by a Frontiers journal. Editorial decisions on the scientific content of a manuscript are independent of whether it has received language editing or proofreading by the partner services, or other services.

### 1.5. Language Style

The default language style at Frontiers is American English. If you prefer your article to be formatted in British English, please specify this on the first page of your manuscript. For any questions regarding style, Frontiers recommends authors to consult the Chicago Manual of Style.

### 1.6. Search Engine Optimization (SEO)

There are a few simple ways to maximize your article's discoverability. Follow the steps below to improve search results of your article:

- include a few of your article's keywords in the title of the article;

- do not use long article titles;

- pick 5 to 8 keywords using a mix of generic and more specific terms on the article subject(s);

- use the maximum amount of keywords in the first 2 sentences of the abstract;

- use some of the keywords in level 1 headings.

### 1.7. CrossMark Policy

CrossMark is a multi-publisher initiative to provide a standard way for readers to locate the current version of a piece of content. By applying the CrossMark logo Frontiers is committed to maintaining the content it publishes and to alerting readers to changes if and when they occur. Clicking on the CrossMark logo will tell you the current status of a document and may also give you additional publication record information about the document.

## 1.8. Title

The title should be concise, omitting terms that are implicit and, where possible, be a statement of the main result or conclusion presented in the manuscript. Abbreviations should be avoided within the title.

Witty or creative titles are welcome, but only if relevant and within measure. Consider if a title meant to be thought-provoking might be misinterpreted as offensive or alarming. In extreme cases, the editorial office may veto a title and propose an alternative.

Authors should try to avoid, if possible:

- titles that are a mere question without giving the answer;

- unambitious titles, for example starting with "Towards," "A description of," "A characterization of," "Preliminary study on;"

- vague titles, for example starting with "Role of...," "Link between...," "Effect of..." that do not specify the role, link, or effect;

- include terms that are out of place, for example the taxonomic affiliation apart from species name.

For Corrigenda, Book Reviews, General Commentaries, and Editorials, the title of your manuscript should have the following format:

- "Corrigendum: Title of Original Article"

- "Book Review: Title of Book"

General Commentaries

- "Commentary: Title of Original Article"

- "Response: Commentary: Title of Original Article"

- "Editorial: Title of Research Topic"

The running title should be a maximum of 5 words in length.

## 1.9. Authors and Affiliations

All names are listed together and separated by commas. Provide exact and correct author names as these will be indexed in official archives. Affiliations should be keyed to the author's name with superscript numbers and be listed as follows: Laboratory, Institute, Department, Organization, City, State abbreviation (only for United States, Canada, and Australia), and Country (without detailed address information such as city zip codes or street names).

Example: Max Maximus 1

1 Department of Excellence, International University of Science, New York, NY, United States.

The Corresponding Author(s) should be marked with an asterisk in the author list. Provide the exact contact email address of the corresponding author(s) in a separate section.

Correspondence:

Max Maximus

maximus@iuscience.edu

If any authors wish to include a change of address, list the present address(es) below the correspondence details using a unique superscript symbol keyed to the author(s) in the author list.

#### 1.10. Consortium/Group and Collaborative Authors

Consortium/group authorship should be listed in the manuscript with the other author(s).

In cases where authorship is retained by the consortium/group, the consortium/group should be listed as an author separated by “,” or “and.” The consortium/group name will appear in the author list, in the citation, and in the copyright. If provided, the consortium/group members will be listed in a separate section at the end of the article.

For the collaborators of the consortium/group to be indexed in PubMed, they do not have to be inserted in the Frontiers submission system individually. However, in the manuscript itself, provide a section with the name of the consortium/group as the heading followed by the list of collaborators, so they can be tagged accordingly and indexed properly.

Example: John Smith, Barbara Smith and The Collaborative Working Group.

In cases where work is presented by the author(s) on behalf of a consortium/group, it should be included in the author list separated with the wording “for” or “on behalf of.” The consortium/group will not retain authorship and will only appear in the author list.

Example: John Smith and Barbara Smith on behalf of The Collaborative Working Group.

#### 1.11. Abstract

As a primary goal, the abstract should render the general significance and conceptual advance of the work clearly accessible to a broad readership. In the abstract, minimize the use of abbreviations and do not cite references, figures or tables.

For Clinical Trial articles, please include the Unique Identifier and the URL of the publicly accessible website on which the trial is registered.

## 1.12. Keywords

All article types require a minimum of 5 and a maximum of 8 keywords.

## 1.13. Text

The entire document should be single-spaced and must contain page and line numbers in order to facilitate the review process. The manuscript should be written using either Word or LaTeX. For templates, see 1.2. Templates.

## 1.14. Nomenclature

The use of abbreviations should be kept to a minimum. Non-standard abbreviations should be avoided unless they appear at least four times, and defined upon first use in the main text. Consider also giving a list of non-standard abbreviations at the end, immediately before the Acknowledgments.

Equations should be inserted in editable format from the equation editor.

Italicize gene symbols and use the approved gene nomenclature where it is available. For human genes, please refer to the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). New gene symbols should be submitted here. Common alternative gene aliases may also be reported, but should not be used alone in place of the HGNC symbol. Nomenclature committees for other species are listed here. Protein products are not italicized.

We encourage the use of Standard International Units in all manuscripts.

Chemical compounds and biomolecules should be referred to using systematic nomenclature, preferably using the recommendations by IUPAC.

Astronomical objects should be referred to using the nomenclature given by the International Astronomical Union provided here.

Life Science Identifiers (LSIDs) for ZOOBANK registered names or nomenclatural acts should be listed in the manuscript before the keywords. An LSID is represented as a uniform resource name (URN) with the following format:

`urn:lsid:<Authority>:<Namespace>:<ObjectID>[:<Version>]`

For more information on LSIDs please see the Code section.

## 1.15. Sections

The manuscript is organized by headings and subheadings. The section headings should be those appropriate for your field and the research itself. You may insert up to 5 heading levels into your manuscript (i.e.,: 3.2.2.1.2 Heading Title).

For Original Research articles, it is recommended to organize your manuscript in the following sections or their equivalents for your field:

## INTRODUCTION

Succinct, with no subheadings.

## MATERIALS AND METHODS

This section may be divided by subheadings and should contain sufficient detail so that when read in conjunction with cited references, all procedures can be repeated. For experiments reporting results on animal or human subject research, an ethics approval statement should be included in this section (for further information, see the Bioethics section.)

## RESULTS

This section may be divided by subheadings. Footnotes should not be used and must be transferred to the main text.

## DISCUSSION

This section may be divided by subheadings. Discussions should cover the key findings of the study: discuss any prior research related to the subject to place the novelty of the discovery in the appropriate context, discuss the potential shortcomings and limitations on their interpretations, discuss their integration into the current understanding of the problem and how this advances the current views, speculate on the future direction of the research, and freely postulate theories that could be tested in the future.

For further information, please check the descriptions defined in the journal's "Article Types" page, which can be seen from the "For Authors" menu on any Frontiers journal page.

### 1.16. Acknowledgments

This is a short text to acknowledge the contributions of specific colleagues, institutions, or agencies that aided the efforts of the authors. Should the content of the manuscript have previously appeared online, such as in a thesis or preprint, this should be mentioned here, in addition to listing the source within the reference list.

### 1.17. Contribution to the Field Statement

When you submit your manuscript, you will be required to briefly summarize in 200 words your manuscript's contribution to, and position in, the existing literature in your field. This should be written avoiding any technical language or non-standard acronyms. The aim should be to convey the meaning and importance of this research to a non-expert. While Frontiers evaluates articles using objective criteria, rather than impact or novelty, your statement should frame the question(s) you have addressed in your work in the context of the current body of knowledge, providing evidence that the findings—whether positive or negative—contribute to

progress in your research discipline. This will assist the Chief Editors to determine whether your manuscript fits within the scope of a specialty as defined in its mission statement; a detailed statement will also facilitate the identification of the editors and reviewers most appropriate to evaluate your work, ultimately expediting your manuscript's initial consideration.

Example Statement on: Markram K and Markram H (2010) The Intense World Theory – a unifying theory of the neurobiology of autism. *Front. Hum. Neurosci.* 4:224. doi: 10.3389/fnhum.2010.00224

Autism spectrum disorders are a group of neurodevelopmental disorders that affect up to 1 in 100 individuals. People with autism display an array of symptoms encompassing emotional processing, sociability, perception and memory, and present as uniquely as the individual. No theory has suggested a single underlying neuropathology to account for these diverse symptoms. The Intense World Theory, proposed here, describes a unifying pathology producing the wide spectrum of manifestations observed in autists. This theory focuses on the neocortex, fundamental for higher cognitive functions, and the limbic system, key for processing emotions and social signals. Drawing on discoveries in animal models and neuroimaging studies in individuals with autism, we propose how a combination of genetics, toxin exposure and/or environmental stress could produce hyper-reactivity and hyper-plasticity in the microcircuits involved with perception, attention, memory and emotionality. These hyper-functioning circuits will eventually come to dominate their neighbors, leading to hyper-sensitivity to incoming stimuli, over-specialization in tasks and a hyper-preference syndrome. We make the case that this theory of enhanced brain function in autism explains many of the varied past results and resolves conflicting findings and views and makes some testable experimental predictions.

## 2. Figure and Table Guidelines

### 2.1. CC-BY Licence

All figures, tables, and images will be published under a Creative Commons CC-BY licence, and permission must be obtained for use of copyrighted material from other sources (including re-published/adapted/modified/partial figures and images from the internet). It is the responsibility of the authors to acquire the licenses, follow any citation instructions requested by third-party rights holders, and cover any supplementary charges.

For additional information, please see the Image Manipulation section.

### 2.2. Figure Requirements and Style Guidelines

Frontiers requires figures to be submitted individually, in the same order as they are referred to in the manuscript; the figures will then be automatically embedded at the end of the submitted manuscript. Kindly ensure that each figure is mentioned in the text and in numerical order.

For figures with more than one panel, panels should be clearly indicated using labels (A), (B), (C), (D), etc. However, do not embed the part labels over any part of the image, these labels will be replaced during typesetting according to Frontiers' journal style. For graphs, there must be a self-explanatory label (including units) along each axis.

For LaTeX files, figures should be included in the provided PDF. In case of acceptance, our Production Office might require high-resolution files of the figures included in the manuscript in EPS, JPEG or TIF/TIFF format.

In order to be able to upload more than one figure at a time, save the figures (labeled in order of appearance in the manuscript) in a zip file and upload them as 'Supplementary Material Presentation.'

Please note that figures not in accordance with the guidelines will cause substantial delay during the production process.

### 2.2.1. Captions

Captions should be preceded by the appropriate label, for example "Figure 1." Figure captions should be placed at the end of the manuscript. Figure panels are referred to by bold capital letters in brackets: (A), (B), (C), (D), etc.

### 2.2.2. Image Size and Resolution Requirements

Figures should be prepared with the PDF layout in mind. Individual figures should not be longer than one page and with a width that corresponds to 1 column (85 mm) or 2 columns (180 mm).

All images must have a resolution of 300 dpi at final size. Check the resolution of your figure by enlarging it to 150%. If the image appears blurry, jagged or has a stair-stepped effect, the resolution is too low.

The text should be legible and of high quality. The smallest visible text should be no less than 8 points in height when viewed at actual size.

Solid lines should not be broken up. Any lines in the graphic should be no smaller than 2 points wide.

Please note that saving a figure directly as an image file (JPEG, TIF) can greatly affect the resolution of your image. To avoid this, one option is to export the file as PDF, then convert into TIFF or EPS using a graphics software.

### 2.2.3. Format and Color Image Mode

The following formats are accepted: TIF/TIFF (.tif/.tiff), JPEG (.jpg), and EPS (.eps) (upon acceptance).

Images must be submitted in the color mode RGB.

#### 2.2.4. Chemical Structures

Chemical structures should be prepared using ChemDraw or a similar program. If working with ChemDraw please use our Frontiers ChemDraw template. If working with another program please follow the guidelines given below:

Drawing settings: chain angle, 120° bond spacing, 18% width; fixed length, 14.4 pt; bold width, 2.0 pt; line width, 0.6 pt; margin width, 1.6 pt; hash spacing, 2.5 pt. Scale 100% Atom Label settings: font, Arial; size, 8 pt.

Assign all chemical compounds a bold, Arabic numeral in the order in which the compounds are presented in the manuscript text.

#### 2.3. Table Requirements and Style Guidelines

Tables should be inserted at the end of the manuscript in an editable format. If you use a word processor, build your table in Word. If you use a LaTeX processor, build your table in LaTeX. An empty line should be left before and after the table.

Table captions must be placed immediately before the table. Captions should be preceded by the appropriate label, for example "Table 1." Please use only a single paragraph for the caption.

Kindly ensure that each table is mentioned in the text and in numerical order.

Please note that large tables covering several pages cannot be included in the final PDF for formatting reasons. These tables will be published as supplementary material.

Please note that tables which are not according to the guidelines will cause substantial delay during the production process.

#### 2.4. Accessibility

Frontiers encourages authors to make the figures and visual elements of their articles accessible for the visually impaired. An effective use of color can help people with low visual acuity, or color blindness, understand all the content of an article.

These guidelines are easy to implement and are in accordance with the W3C Web Content Accessibility Guidelines (WCAG 2.1), the standard for web accessibility best practices.

##### A. Ensure sufficient contrast between text and its background

People who have low visual acuity or color blindness could find it difficult to read text with low contrast background color. Try using colors that provide maximum contrast.

WC3 recommends the following contrast ratio levels:

Level AA, contrast ratio of at least 4.5:1

Level AAA, contrast ratio of at least 7:1

Level AA

Contrast ratio 4.6:1

Level AA

Contrast ratio 9.5:1

You can verify the contrast ratio of your palette with these online ratio checkers:

WebAIM

Color Safe

B. Avoid using red or green indicators

More than 99% of color-blind people have a red-green color vision deficiency.

C. Avoid using only color to communicate information

Elements with complex information like charts and graphs can be hard to read when only color is used to distinguish the data. Try to use other visual aspects to communicate information, such as shape, labels, and size. Incorporating patterns into the shape fills also make differences clearer; for an example please see below:

Avoid Using Color

### 3. Supplementary Material

Data that are not of primary importance to the text, or which cannot be included in the article because they are too large or the current format does not permit it (such as videos, raw data traces, powerpoint presentations, etc.), can be uploaded as Supplementary Material during the submission procedure and will be displayed along with the published article. All supplementary files are deposited to Figshare for permanent storage and receive a DOI.

Supplementary Material is not typeset, so please ensure that all information is clearly presented without tracked changes/highlighted text/line numbers, and the appropriate caption is included in the file. To avoid discrepancies between the published article and the supplementary material, please do not add the title, author list, affiliations or correspondence in the supplementary files.

The Supplementary Material can be uploaded as Data Sheet (Word, Excel, CSV, CDX, FASTA, PDF or Zip files), Presentation (PowerPoint, PDF or Zip files), Image (CDX, EPS, JPEG, PDF, PNG or TIF/TIFF), Table (Word, Excel, CSV or PDF), Audio (MP3, WAV or WMA) or Video (AVI, DIVX, FLV, MOV, MP4, MPEG, MPG or WMV).

For Supplementary Material templates (LaTeX and Word), see our Supplementary Material templates.

## 4. References

All citations in the text, figures or tables must be in the reference list and vice-versa.

The names of the first six authors followed by et al. and the DOI (when available) should be provided.

The reference list should only include articles that are published or accepted.

Unpublished data, submitted manuscripts or personal communications should be cited within the text only, for the article types that allow such inclusions.

For accepted but unpublished works use "in press" instead of page numbers.

Data sets that have been deposited to an online repository should be included in the reference list. Include the version and unique identifier when available.

Personal communications should be documented by a letter of permission.

Website URLs should be included as footnotes.

Any inclusion of verbatim text must be contained in quotation marks and clearly reference the original source.

Preprints can be cited as long as a DOI or archive URL is available, and the citation clearly mentions that the contribution is a preprint. If a peer-reviewed journal publication for the same preprint exists, the official journal publication is the preferred source. See the Preprints section for more information.

### 4.1. Science, Engineering and Humanities Journals

#### 4.1.1. In-text Citations

For works by a single author, include the surname, followed by the year.

For works by two authors, include both surnames, followed by the year.

For works by more than two authors, include only the surname of the first author followed by et al., followed by the year.

For Humanities and Social Sciences articles, include the page numbers.

#### 4.1.2. Reference List

##### ARTICLE IN A PRINT JOURNAL

Sondheimer, N., and Lindquist, S. (2000). Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol. Cell.* 5, 163-172.

#### ARTICLE IN AN ONLINE JOURNAL

Tahimic, C.G.T., Wang, Y., Bikle, D.D. (2013). Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front. Endocrinol.* 4:6. doi: 10.3389/fendo.2013.00006

#### ARTICLE OR CHAPTER IN A BOOK

Sorenson, P. W., and Caprio, J. C. (1998). "Chemoreception," in *The Physiology of Fishes*, ed. D. H. Evans (Boca Raton, FL: CRC Press), 375-405.

#### BOOK

Cowan, W. M., Jessell, T. M., and Zipursky, S. L. (1997). *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York: Oxford University Press.

#### ABSTRACT

Hendricks, J., Applebaum, R., and Kunkel, S. (2010). A world apart? Bridging the gap between theory and applied social gerontology. *Gerontologist* 50, 284-293. Abstract retrieved from Abstracts in Social Gerontology database. (Accession No. 50360869)

#### WEBSITE

World Health Organization. (2018). E. coli. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> [Accessed March 15, 2018].

#### PATENT

Marshall, S. P. (2000). Method and apparatus for eye tracking and monitoring pupil dilation to evaluate cognitive activity. U.S. Patent No 6,090,051. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

#### DATA

Perdiguero P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. Data from: Massive sequencing of *Ulms minor*'s transcriptome provides new molecular tools for a genus under the constant threat of Dutch elm disease. Dryad Digital Repository. (2015)  
<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837>

#### THESES AND DISSERTATIONS

Smith, J. (2008) Post-structuralist discourse relative to phenomenological pursuits in the deconstructivist arena. [dissertation/master's thesis]. [Chicago (IL)]: University of Chicago

#### PREPRINT

Smith, J. (2008). Title of the document. Preprint repository name [Preprint]. Available at: <https://persistent-url> (Accessed March 15, 2018).

#### 4.1.3. Resources

Chicago Manual of Style

Frontiers Science Endnote Style

Frontiers Science, Engineering and Humanities Bibstyle

4.2. Health, Physics, and Mathematics Journals

4.2.1. In-text Citations

Please apply the Vancouver system for in-text citations.

In-text citations should be numbered consecutively in order of appearance in the text—identified by Arabic numerals in the parenthesis for Health articles and in square brackets for Physics and Mathematics articles.

4.2.2. Reference List

ARTICLE IN A PRINT JOURNAL

Sondheimer N, Lindquist S. Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol Cell* (2000) 5:163-72.

ARTICLE IN AN ONLINE JOURNAL

Tahimic CGT, Wang Y, Bikle DD. Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front Endocrinol* (2013) 4:6. doi: 10.3389/fendo.2013.00006

ARTICLE OR CHAPTER IN A BOOK

Sorenson PW, Caprio JC. "Chemoreception,". In: Evans DH, editor. *The Physiology of Fishes*. Boca Raton, FL: CRC Press (1998). p. 375-405.

BOOK

Cowan WM, Jessell TM, Zipursky SL. *Molecular and Cellular Approaches to Neural Development*. New York: Oxford University Press (1997). 345 p.

ABSTRACT

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, editor. *Genetic Programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3–5; Kinsdale, Ireland*. Berlin: Springer (2002). p. 182–91.

WEBSITE

World Health Organization. *E. coli* (2018). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> [Accessed March 15, 2018].

## PATENT

Pagedas AC, inventor; Ancel Surgical R&D Inc., assignee. Flexible Endoscopic Grasping and Cutting Device and Positioning Tool Assembly. United States patent US 20020103498 (2002).

## DATA

Perdiguer P, Venturas M, Cervera MT, Gil L, Collada C. Data from: Massive sequencing of *Ulms minor*'s transcriptome provides new molecular tools for a genus under the constant threat of Dutch elm disease. Dryad Digital Repository. (2015)  
<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.ps837>

## THESES AND DISSERTATIONS

Smith, J. (2008) Post-structuralist discourse relative to phenomenological pursuits in the deconstructivist arena. [dissertation/master's thesis]. [Chicago (IL)]: University of Chicago

## PREPRINT

Smith, J. Title of the document. Preprint repository name [Preprint] (2008). Available at: <https://persistent-url> (Accessed March 15, 2018).

### 4.2.3. Resources

Citing Medicine

Frontiers Health Endnote Style

Frontiers Health and Physics Bibstyle