LEANDRO BARBATO

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS
PRODUTORAS DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) E
AmpC PLASMIDIAL ISOLADAS DE ANIMAIS DE COMPANHIA E BÚFALOS NO
ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof^o Dr^o Nilton Lincopan

Versão original

São Paulo
2012

RESUMO

BARBATO, L. **Detecção e caracterização de bactérias Gram-negativas produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e AmpC plasmidial isoladas de animais de companhia e búfalos no estado de São Paulo.** 2012 56 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A emergência de bactérias multirresistentes (MR) é um problema de saúde pública, consequência direta do uso exacerbado de antibacterianos tanto na medicina humana e veterinária como no agronegócio. O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo de vigilância epidemiológica de bactérias MR, elucidando mecanismos moleculares de resistência e relação clonal em isolados obtidos de amostras de búfalo de bubalinocultura — cujo mercado está em expansão no Brasil —, e em animais de estimação apresentando sinais e sintomas clínicos de infecção urinária, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo. O estudo relata resultados inéditos referentes à disseminação de bactérias MR, com alto índice de resistência a β -lactâmicos e quinolonas de uso humano e veterinário em criações de búfalos e animais de estimação, constituindo o primeiro reporte mundial da emergência de cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro (ESBL) do tipo CTX-M-8 e AmpC plasmidial (pAmpC) CMY-2 na bubalinocultura. Por outro lado, a presença de cepas de *E. coli* produtoras de ESBL do tipo CTX-M-15, CTX-M-8 e CTX-M-2, e pAmpC CMY-1, CMY-2 e DHA-1 em animais de companhia, é relatada pela primeira vez no Brasil. Nos isolados de *E. coli* ESBL positivos, não foi constatada relação clonal, sendo que 55% dos isolados produtores de β -lactamases pertenceram ao grupo filogenético de baixa virulência A e B1, principalmente em búfalos, o que reforça a hipótese de uma seleção endógena da microbiota comensal em animais de produção, favorecida pela transferência horizontal de genes. Já em animais de companhia, a análise da filogenética de virulência em *E. coli* denotou o predomínio dos grupos filogenéticos de alta virulência B2 e D o que estaria diretamente relacionado com os casos de ITU e sepse. As análises de MLST mostraram grande diversidade entre as cepas estudadas revelando ancestrais na Ásia, África, América do Sul, América do Norte e Europa.

Palavras chave: ESBL. *Escherichia coli*. búfalos. CTX-M. CTX-M-15. CTX-M-2. CTX-M-8. pAmpC.

ABSTRACT

BARBATO, L. **Detection and characterization of Gram-negative bacteria producers extended spectrum β - lactamases (ESBL) and pAmpC isolated for pets and buffalo in São Paulo.** 2012. 56 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The emergence of multidrug-resistant bacteria (MDR) is a public health issue, which is related to the overuse and misuse of antibiotics both in human and veterinary medicine, as well as, agribusiness. This study aimed to conduct an epidemiological surveillance on MDR bacteria, elucidating molecular mechanisms of resistance and clonal relatedness among Gram-negative bacilli recovered from samples from buffalo — growth market into Brazil — and in pets exhibiting signs and symptoms related to urinary tract infection, admitted at the Veterinary Hospital of the University of São Paulo. The study reports the spread of MDR bacteria exhibiting a high resistance profile to veterinary- and human-use β -lactams and quinolones, in livestock of buffalos and in pets, constituting the first worldwide report of CTX-M-8-type extended-spectrum β -lactamase (ESBL)- and CMY-2-type plasmid AmpC (pAmpC)-producing *E. coli* strains in buffalo. Moreover, to the best of knowledge, this is the first report of CTX-M-15-, CTXM-8-, CTX-M-2, CMY-1, CMY-2- and DHA-1-producing *E. coli* strains in pets in Brazil. With respect to the origin of resistance, we found no clonal relatedness among MDR *E. coli* isolates. Moreover, 55% β -lactamase-producing *E. coli* strains belonged to the low-virulence phylogenetic groups A and B1, mainly in buffalos, which reinforces the hypothesis about endogenous selection of commensal microbiota in food-animals, due to the selective pressure caused by broad-spectrum antibiotic use and/or acquired by the horizontal gene transfer. Already in companion animals, the phylogenetic analysis of virulence in *E. coli* denoted the predominance of the highly virulent phylogenetic groups B2 and D which would be directly related to the cases of UTI and sepsis. The MLST analysis showed diversity among the strains, revealing common ancestors in Asia, Africa, South America, North America and Europe.

Keyword: ESBL. *Escherichia coli*. buffalo. CTX-M. CTX-M-15. CTX-M-2. CTX-M-8. pAmpC.

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um importante problema de saúde pública mundial, inerente ao uso exacerbado de antibacterianos tanto na medicina humana e veterinária como no agronegócio (SILVA; LINCOPAN, 2012). A ampla disseminação de bactérias capazes de expressar enzimas que conferem resistência a múltiplos antimicrobianos sugere o meio ambiente como um potencial reservatório de contaminação da água e alimentos consumidos por animais e humanos (LEVERSTEIN et al., 2011), no entanto, a origem dessas cepas resistentes ainda gera grandes dúvidas devido a diversas vias de transmissão que esses agentes bacterianos podem usar para se disseminar. Diversos trabalhos têm apontado para o crescimento mundial da resistência a diversos antimicrobianos a partir de membros da família Enterobacteriaceae, como o surgimento de β -lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês *extended-spectrum β -lactamase*), resistência a carbapenêmicos, quinolonas, fluoroquinolonas e demais antimicrobianos utilizados como alternativa terapêutica nos casos de infecção bacterianas causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.* entre outras (JONG et al., 2011; LIMA, 2011; SOUZA, 2008).

1.1 Resistência bacteriana por produção de enzimas ESBL (*Extended-spectrum β -Lactamases*)

Dentre os agentes bacterianos de maior importância na medicina humana/veterinária e no agronegócio destacam-se os patótipos de *Escherichia coli* capazes de causar infecções intestinais e extra-intestinais como diarreia, infecção do trato urinário (ITU) e sepse. Estas infecções são usualmente tratadas por meio de administração de quimioterápicos e antibióticos, dentre eles, os mais empregados são os β -lactâmicos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Nesta categoria estão incluídas as penicilinas, cefalosporinas de 1º, 2º, 3º, e 4º geração, monobactâmicos (aztreonam), e os carbapenêmicos (imipenen, meropenem, ertapenem e doripenem). Todos estes compostos possuem o anel β -lactâmico em sua estrutura molecular (ROSÁRIO; GRUMACH, 2006). Assim, a resistência a esses antimicrobianos ocorre, principalmente, pela inativação mediada pela hidrólise do anel β -lactâmico do núcleo

estrutural das penicilinas – o ácido 6-aminopenicilânico – provocando a formação do ácido penicilínico desprovido de atividade antimicrobiana (Figura 1) (TAVARES, 2001).

Figura 1- Reação de inativação do anel β - lactâmico por enzimas ESBL

Fonte: Silva e Lincopan, 2012.

As ESBL ganharam notoriedade na década de 80, com introdução dos antimicrobianos da classe das cefalosporinas de 3ª geração. A implantação desse medicamento pelo mercado farmacêutico foi um grande marco para o tratamento da medicina humana e veterinária. Infelizmente, poucos anos depois surgiram as primeiras cepas que apresentaram resistência e esse medicamento (BONNET, 2003; DIERIKX et al., 2012).

Dentre os mecanismos de resistência descritos, atualmente, a produção de ESBL tem sido considerada uma urgência clínica e epidemiológica mundial, uma vez que a sua presença confere resistência aos β -lactâmicos de amplo espectro, incluindo às cefalosporinas de 3ª geração, sendo estas, inibidas, *in vitro*, pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. Dentre as variantes enzimáticas descritas, as ESBL do tipo TEM e SHV, foram inicialmente reconhecidas em diferentes espécies de bactérias Gram-negativas. Atualmente, estas variantes têm sido gradativamente substituídas por enzimas do tipo CTX-M (EWERS et al., 2010; MINARINI et al., 2007; PATERSON; BONOMO, 2005). Essas enzimas podem ser classificadas quanto a sua estrutura molecular, denominada classificação de Ambler, esse esquema classifica as β -lactamases quanto a similaridade de aminoácidos e é dividida em quatro grupos: A, B, C e D. As ESBLs estão majoritariamente na classe A de Ambler, com exceção das enzimas OXA que são pertencentes a classe D (RADICE, 2002). Na classificação de Bush-Jacob-Medeiros, as ESBLs são classificadas quanto a afinidade pelo substrato, nessa classificação, as enzimas CTX-M, TEM e SHV são classificadas como pertencentes ao grupo 2be, e as OXA

são incluídas no grupo 2d (BUSH, 2010). A maioria das ESBLs são codificadas por genes plasmidiais (STURENBURG et al., 2005), sendo que aproximadamente 123 variantes pertencem ao grupo CTX-M até dezembro de 2011 (CANTÓN; GONZALÉZ-ALBA; GALÁN, 2012). Acredita-se que genes do tipo *bla*_{CTX-M} tenham uma origem cromossomal relacionada a espécies de *Kluyvera*, a hipótese é que esse gene tenha sido mobilizado do cromossomo bacteriano, sendo transferido por elementos genéticos como transposons e integrons para plasmídeos (CANTÓN; GONZALÉZ-ALBA; GALÁN, 2012). Cepas contendo esses genes, geralmente apresentam concentração inibitória mínima (CIM) elevada para cefotaxima (>64 µg/ml) e diminuída para ceftazidima (2 a 8 µg/ml), fato que justifica o nome CTX-M, que é dado em referência a sua potente ação hidrolítica contra a cefotaxima.

Desde sua detecção na década de 80, esta enzima tem mostrado grande capacidade de disseminação, sendo atualmente a enzima ESBL mais frequente em todo mundo tanto em bactérias de origem nosocomial quanto de origem comunitária (BONNET, 2004), além de ser considerado atualmente, o principal mecanismo de resistência em bactérias Gram-negativas (BUSH; FISHER, 2011).

No Brasil, a produção de ESBL em membros da família Enterobacteriaceae também é alarmante, uma vez que variantes do tipo TEM, SHV, CTX-M, OXA, BES, GES e VEB têm sido amplamente descritas em animais humanos relacionados ou não ao ambiente hospitalar.

Infelizmente, não existem programas de vigilância de abrangência nacional referente à resistência bacteriana e a seus mecanismos, tornando-se difícil estimar a proporção de cepas produtoras de ESBL na federação. Ainda de acordo com a família CTX-M, as β -lactamases mais frequentemente identificadas em isolados clínicos em território brasileiro incluem os grupos CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9 (Figura 2) (SILVA; LINCOPAN, 2012).

Figura 2 - Distribuição geográfica das cepas produtoras de ESBL de origem humana no Brasil.

Fonte: Silva e Lincopan, 2012.

1.2 Resistência mediada por AmpC β -lactamases

São clinicamente importantes também as AmpC β -lactamases. São cefalosporinas codificadas por cromossomos de bactérias da família Enterobacteriaceae e mais recentemente por plasmídeos, estas são capazes de gerar resistência a maioria das penicilinas podendo conferir resistência a cefalosporinas de 3ª geração quando expressas em altos níveis (JACOBY, 2009). Essas enzimas têm sido encontradas tanto em infecções nosocomiais, quanto em infecções na comunidade. Uma pequena variação na sequência de aminoácidos pode gerar uma nova variante assim como na maioria das enzimas que conferem resistência a antimicrobianos (JACOBY, 2009). No Brasil estudos tem identificado a presença de AmpC plasmidial (pAmpC), já foram descritos os genes *bla*_{CMY-2} em *Escherichia coli*, *bla*_{DHA-1} em *Klebsiella pneumoniae* em infecções hospitalares (PAVEZ AGUILAR, 2009), além de sua detecção em diversas outras espécies como por exemplo em *Salmonella enterica* (PEIRANO, 2006).

1.3 Resistência as quinolonas

Outro grande problema para a terapêutica humana e veterinária é a resistências aos antimicrobianos da classe das quinolonas. Esses antimicrobianos tem sido usados por muitos anos na medicina humana/veterinária no tratamento de infecções no trato urinário (ITU) causada por bacilos Gram-negativos em animais de companhia (RODRIGUÉZ-MARTINÉZ et al., 2006) e seu uso indiscriminado tem gerado uma pressão seletiva que favorece a instalação definitiva da microbiota resistente a essas drogas. Muitas pesquisas realizadas no Brasil tem sido feitas desde a primeira descrição da resistência a fluoroquinolonas mediada por plasmídeos, em 2007 (CASTANHEIRA, et al., 2007). Estes estudos tem demonstrado um grande crescimento da resistência a essas drogas (quinolonas e fluoroquinolonas) em membros da família Enterobacteriaceae, em sua maioria coletadas de pacientes hospitalizados em diferentes regiões do país, além de sua detecção em pacientes relacionados a comunidade e também já existem descrições dessas cepas no ambiente, como por exemplo, em rios da cidade de São Paulo (FERRARI et al., 2011; FONTES et al., 2011; MINARINI, et al., 2008; PEIRANO et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2010). Essa resistência mediada por plasmídeos tem sido frequentemente relacionada à presença dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*.

1.4 Impacto das ESBL no agronegócio e na medicina veterinária

A disseminação de cepas portadoras de genes de resistência na medicina veterinária também é considerada um problema de saúde publica globalizado, pois sua expressão dificulta ou impossibilita o tratamento da infecção em animais quando necessário, além do fato de que muitos animais de companhia portadores de cepas ESBL podem representar uma fonte constante de disseminação para humanos devido à relação próxima desenvolvida entre essas espécies, sendo também uma possível fonte para o ambiente.

De forma crescente, animais de companhia vêm sendo reportados como portadores de cepas produtoras de ESBL, por vezes causando patologias (DIERIKX et al., 2012; EWERS et al., 2010; MEYER et al., 2012; SUN et al., 2010).

No agronegócio, os principais problemas causados por essas cepas resistentes, são as perdas econômicas, pois este setor contribui atualmente com um

terço do PIB nacional segundo a Confederação da Agricultura e Agropecuária do Brasil, o que representa uma grande responsabilidade para o país. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2004) no Brasil, eram 1.400.000 animais na década de 90, sendo que esta população sofreu um aumento constante a partir de 1997. A Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) estima que a população de búfalos no Brasil em 2004 era de 3.000.000 (ABCB, 2004).

Muitos estudos têm apontado para o aumento de resistência bacteriana a antimicrobianos em isolados de animais do agronegócio (KUNZ et al., 2011; MEDINA et al., 2011; SILVA et al., 2010). *Escherichia coli* é uma das bactérias responsáveis pelo maior número de infecções causadas em animais, sendo uma das maiores causas de diarreia entre bezerros (BERGEY'S, 1994; TARR, 1994) e vem sendo relatada em artigos a presença dessas cepas produtoras de ESBL (CORTES; BLANCO, 2010), o que significa uma grande perda econômica para a pecuária que esta em grande ascendência no país. Além da *Escherichia coli*, outras espécies bacterianas vêm sendo identificadas como comensais ou patógenos de outros animais de interesse para o agronegócio. Um estudo recente revelou que 13 cepas de *Salmonella enterica* pertencentes ao sorotipo Schwarzengrund e Agona foram isoladas de granjas avícolas e de alimentos derivados, sendo essas, produtoras de enzimas CTX-M-2, cujos genes foram mobilizados por plasmídeos do tipo IncP (SILVA et al., 2012).

Assim, tanto a identificação precoce quanto o controle de possíveis infecções associadas, são medidas necessárias para garantir a qualidade e inocuidade dos produtos alimentares de origem animal, contribuindo para a consolidação do Brasil como uma das maiores potências do agronegócio no mundo.

Uma vez que não existem dados sobre a prevalência de fenótipos MR com ênfase na produção de ESBL por bactérias Gram-negativas isoladas de animais de companhia e do agronegócio, no Brasil, o presente estudo visou contribuir com dados de utilidade para programas de vigilância epidemiológica, mostrando um panorama atual desta problemática na medicina veterinária e no agronegócio.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo confirma a disseminação de bactérias MR em criações de búfalos e animais de companhia com ITU, constituindo o primeiro relato mundial sobre a emergência de cepas de *E. coli* produtoras de β -lactamases do tipo CTX-M-8 e CMY-2 na bubalinocultura. Nos animais de companhia, a presença de cepas de *E. coli* produtoras de ESBL do tipo CTX-M-15, CTX-M-8 e CTX-M-2, e AmpC CMY-1, CMY-2 e DHA-1 em animais de companhia, é relatada pela primeira vez no Brasil, chamando a atenção para a necessidade de implementação de programas de uso racional de antibacterianos com o intuito de prevenir e/ou controlar precocemente um potencial veículo e/ou fonte de disseminação para seres humanos, garantindo, adicionalmente, a qualidade e inocuidade de alimentos de origem animal obtidos de animais de produção.

As análises de MLST revelam a capacidade de disseminação dessas cepas por todo o mundo, fato que aparenta acompanhar a globalização, ou seja, a transição de pessoas e objetos pelos continentes, poderíamos então dizer que a disseminação de cepas bacterianas pelo mundo acompanha o desenvolvimento econômico do planeta.

Esses dados alertam que as fontes de contaminação estão interligadas em alto grau de complexidade, sendo então, talvez mais apropriado dedicar esforços e pesquisas, para encontrar alternativas terapêuticas para essas cepas do que empenhar esforços na prevenção de sua disseminação.

Esse estudo deve alertar as autoridades de saúde pública, uma vez que essas cepas estão dispersas em animais de companhia e do agronegócio, gerando prejuízo a saúde animal e humana, podendo gerar no futuro um grande problema econômico para a pecuária no país que por enquanto está em grande ascensão, assim, como constituir uma potencial fonte de transmissão para o ser humano e ecossistemas relacionados.

REFERÊNCIAS*

AGUILAR, M. A. P. **Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em Enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros.** 2009. 133 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BUFÁLOS. **Perspectivas otimistas para a criação de búfalos no país.** Disponível em: <<http://www.sba1.com/pt/noticias/agronegocio/perspectivas-otimistas-para-a-criacao-de-bufalos-no-pais>>. Acesso em: 05 jun. 2012.

BARANIAK, A.; FIETT, J.; MRÓWKA, A.; WALORY, J.; HRYNIEWICZ, W.; GNIADKOWSKI M. Evolution of TEM-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical Enterobacteriaceae strains in Poland. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 5, p. 1872-1880, 2005.

BERGEY'S, D. H. Gram-negative, aerobic/microaerophilic rods and cocci. **Manual of determinative bacteriology.** 9th ed. New York: Springer, 1994. p. 787-789

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; BLANCO, J.; GONZÁLEZ, E.A.; MORA, A.; PRADO, C.; FERNANDEZ, L.; RIO, M.; RAMOS, J.; ALONSO, M.P. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. **Epidemiol. Infect.**, v. 117, p. 251-257, 1996a.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; BLANCO, J.; ALONSO, M.P.; BALSALOBRE, C.; MOURIÑO, M.; MADRID, C.; JUÁREZ, A. Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). **J. Microbiol. Met.**, v. 26, p. 95-101, 1996b.

BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MORA, A.; PRADO, C.; RÍO, M.; FERNÁNDEZ, L.; FERNÁNDEZ, M. J.; SÁINZ, V.; BLANCO, J. Detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef using immunomagnetic separation. **Microbiologia**, v. 12, p. 385-394, 1996c.

BLANCO, M.; ALONSO, M. P.; NICOLAS-CHANOINE, M. H.; DAHBI, G.; MORA, A.; BLANCO, J. E.; LÓPEZ, C.; CORTÉS, P.; LLAGOSTERA, M.; LEFLON-GUIBOUT, V.; PUENTES, B.; MAMANI, R.; HERRERA, A.; COIRA, M. A.; GARCÍA-GARROTE, F.; PITA, J. M.; BLANCO, J. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum betalactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4- ST131 producing CTX-M-15. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 1135-1141, 2009.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BONNET, R.; RECOLE, C.; BARADUC, R.; CHANAL, C.; SIROT, D.; DE CHAMPS, C.; SIROTI, J. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 29-35, 2003.

BORRIELLO, G.; LUCIBELLI, M.G.; DE CARLO, E.; AURIEMMA, C.; COZZA, D.; ASCIONE, G.; SCOGNAMIGLIO, F.; IOVANE, G.; GALIERO, G. Characterization of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from diarrhoeic Mediterranean water buffalo calves (*Bubalus bubalis*). **Res. Vet. Sci.**, v. 93, p. 18-22, 2012

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Bovinos e bubalinos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 30 maio 2012.

BRUN-BUISSON, C.; LEGRAND, P.; PHILIPPON, A.; MONTRAVERS, F.; ANSQUER, M.; DUVAL, J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. **Lancet**, v. 8554, p. 302-306, 1987.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, p. 969–976, 2010.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from Gram-negative bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 65, p. 455-478, 2011.

BUSH, K.; JACOBY, G. **β -lactamases classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes**. Disponível em: <<http://www.lahey.org/studies/>>. Acesso: 20 May 2012.

CANTÓN, R.; GONZALÉZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C.; CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. **Front. Microbiol.**, v. 110, p. 3, 2012.

CASTANHEIRA, M.; PEIRANA, A. S.; NICOLETTI, A. G.; PIGNATARI, A. C.; BARTH, A. L.; GALES, A. C. First report of plasmid-mediated qnrA1 in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, p. 1527-1529, 2007.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 4555-4558, 2000.

CLERMONT, O.; JOHNSON, J. R.; MENARD, M.; DENAMUR, E. Determination of *Escherichia coli* O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, p. 129-136, 2007.

CLERMONT, O.; LAVOLLAY, M.; VIMONT, S.; DESCHAMPS, C.; FORESTIER, C.; BRANGER, C.; DENAMUR, E.; ARLET, G. The CTX-M-15-17 producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 1024-1028, 2008.

CORTÉS, P.; BLANCO, V.; MORA, A.; DAHBI, G.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; LÓPES, C.; AADREU, A.; NAVARRO, F.; ALONSO, M. P.; BOU, G.; BLANCO, J.; LAGOSTERA, M. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p. 2799-2805, 2010.

DIERIKX, C. M.; VAN DUIJKEREN, E.; SCHOORMANS A. H.; VAN ESSEN ZANDBERGEN A.; VELDMAN, K.; KANT, A.; HUIJSDENS X.W.; VAN DER ZWALUW, K.; WAGENAAR, J. A.; MEVIUS D. J. Occurrence and characteristics of extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 67, p. 1368-1374, 2012.

EDELSTEIN, M.; PIMKIN, M.; PALAGIN, I.; EDELSTEIN, I.; STRATCHOUNSKI, L.; Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, p. 3724-3732, 2003.

EWERS, C.; GROBBEL, M.; STAMM, I.; KOPP, P. A.; DIEHL, I.; SEMMIER, T.; FRUTH, A.; BEUTLICH, J.; GUERRA, B.; WIELER, L. H.; GUENTHER, S. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* among companion animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1-10, 2010.

FALBO, V.; FAMIGLIATTI, M.; CAPRIOLI, A. Gene block encoding production of cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin in *Escherichia coli* isolates from extraintestinal infections. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2182-2187, 1992.

FEHLBERG, L. C.; XAVIER, D. E.; PERARO, P. P.; MARRA, A. R.; EDMOND, M. B.; GALES, A. C. Beta-lactam resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing bloodstream infections: comparative results between Brazilian and American isolates. **Microb. Drug. Resist.**, v. 18, p. 402-407, 2012.

FERRARI, L.; GALIANA, A. Plasmid mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella spp.* Strains isolated in Brazil. **J. Infect. Dev. Ctries**, v. 5, p. 496-498, 2011.

FONTES, L. C.; OLIVEIRA, S.; SILVA, K. C.; HACHICH, E. M.; SATO, M. I. Z.; LINCOPAN, N. Disseminação dos genes *bla*_{CTX-M}, *qnr*, *bla*_{SPM-1} e *rmtD* em BGN isolados nos Rios Tietê e Pinheiros, São Paulo, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 26., Foz do Iguaçu, Paraná. **Anais...** Foz do Iguaçu, Paraná: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011.

GANNON, V. P.; RASHED, M.; KING, R. K.; THOMAS, E. J. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 1268-1274, 1993.

HARADA, K.; NAKAI, Y.; KATAOKA, Y. Mechanisms of resistance to cephalosporin and emergence of O25b-ST131 clone harboring CTX-M-27 β lactamase in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from dogs and cats in Japan. **Microbiol. Immunol.**, v. 56, p. 480-485, 2012.

HARTMAN, A. B.; VENKATESAN, M.; OAKS, E. V.; BUYSSE, J. M. Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 1905-1915, 1990.

JACOBY, G. A.; SUTTON, L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 35, p. 164-169, 1991.

JACOBY, G. A.; GACHARNA, N.; BLACK, T. A.; MILLER, G. H.; HOOPER, D. C. Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, p. 1665-1666, 2009.

JONG, A. Fluoroquinolone resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* from healthy livestock and poultry in the EU. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 239-245, 2011

KUNZ, F.; CORTI, S.; GIEZENDANNER, N.; STEPHAN, R.; WITTENBRINK, M.; ZWEIFEL, C. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from mastitis milk samples from sheep and goats. **Schweiz Arch. Tierheilkd**, v. 153, p. 63-69, 2011.

LAVIGNE, J. P.; BLANC-POTARD, A. B.; BOURG, G.; MOREAU, J.; CHANAL, C.; BOUZIGES, N.; O'CALLAGHAN, D.; SOTTO, A. Virulence genotype and nematode-killing properties of extra-intestinal *Escherichia coli* producing CTX-M β -lactamases. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 12, p. 1199-1206, 2006.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 1189-1193, 1992.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A.; DIERIKX, C. M.; COHEN STUART, J.; VOETS, G. M.; VAN DEN MUNCKHOF, M. P.; VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A.; PLATTEEL, T.; FLUIT, A. C.; VAN DE SANDE-BRUINSMA, N.; SCHARINGA, J.; BONTEN, M. J.; MEVIUS, D. J.; National ESBL surveillance group. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, p. 873-880, 2011.

LIMA, A. L.; OLIVEIRA, P. R.; PAULA, A. P.; DAL-PAZ, K.; ALMEIDA, J. N.; FÉLIX, J. R. C. S.; ROSSI, F. Carbapenem stewardship: positive impact on hospital ecology. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 15, p. 1-5, 2011.

LIVERMORE, D. M. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol.**, v. 8, p. 557-584, 1995.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMEIER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 18, p. 268-281, 2012.

MARKLUND, B. I.; TENNENT, J. M.; GARCIA, E.; HAMERS, A.; BAGA, M.; LINDBERG F.; GAASTRA, W.; NORMARK, S. Horizontal gene transfer of the *Escherichia coli* *pap* and *prs* pili operons as mechanism for the development of tissue-specific adhesive properties. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 2225-2242, 1992.

MEDEIROS, A. A. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of betalactamic antibiotics. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 9-45, 1997.

MEDINA, A.; HORCAJO, P.; JURADO, S.; DE LA FUENTE, R.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; ORDEN, J. A. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* strains from ruminants. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 23, p. 91-95, 2011.

MEYER, E.; GASTMEIER, P.; KOLA, A.; SCHWAB, F. Pet animals and foreign travel are risk factors for colonisation with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. **Infection**, v. 40, p. 685-687, 2012.

MINARINI, L. A. R.; GALES, A. C.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L. C. Prevalence of community-occurring extended spectrum beta lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Current Microbiology**, v. 54, p. 335-341, 2007.

MINARINI, L. A.; POIREL, L. CATTOIR, V.; DARINI, A. L.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 62, p. 474-478, 2008.

MORENO, A.; BELLO, H.; GUGGIAANA, D.; DOMÍNGUEZ, M.; GONZÁLEZ G. Extended-spectrum beta-lactamases belonging to CTX-M group produced by *Escherichia coli* strains isolated from companion animals treated with enrofloxacin. **Vet. Microbiol.**, v. 129, p. 203-208, 2008.

MUZAHEED, Y.; DOI, J. M.; ADAMS-HADUCH, A.; ENDIMIANI, H. E. SIDJABAT, S. M.; PATERSON, D. L. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* among inpatients and outpatients with urinary tract infection in Southern India. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 61, p. 1393–1394, 2008.

O'KEEFE, A.; HUTTON, T. A.; SCHIFFERLI, D. M.; RANKIN, S. C.; First detection of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* urinary tract isolates from dogs and cats in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 54, p. 3489-3492, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Vencendo resistência microbiana. *World Health Report on Infections Disease*, 2000. Disponível em: <<http://www.ccih.med.br/vencendoresistencia.html>> Acesso em: 20 maio 2012.

OSUGUI, L. **Pesquisa e caracterização de amostras de ExPEC (“Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário ITU de cães e gatos**, 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PARK, C. H.; ROBICSEK, A.; JACOBY, G. A.; SAHM, D.; HOOPER, D. C. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 50, p. 3953-3955, 2006.

PARK, Y. J.; YU, J. K.; KIM, S. I.; LEE, K.; ARAKAWA, Y. Accumulation of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes, *qepA* and *qnrS1*, in *Enterobacter aerogenes* co-producing RmtB and class A beta-lactamase LAP-1. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, v. 39, p. 55-59, 2009.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol.*, v. 18, p. 657-686, 2005.

PAVEZ, M.; NEVES, P.; DROPA, M.; MATTE, M. H.; GRINBAUM, R.; DE ARAUJO, M. R. E.; MAMIZUKA, E.M.; LINCOPAN, N. *Escherichia coli* produtora de beta-lactamase ampC tipo CMY-2 resistente a antibiótico carbapenêmico, no Brasil. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA, 1., 2008, Gramado, Rio Grande do Sul. *Anais...* Gramado, Rio Grande do Sul, 2008.

PEIRANO, G.; AGERSO, Y.; ARESTRUP, F. M.; DOS REIS, E. M.; DOS PRAZERES. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 58, p. 305-309, 2006.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; PASSOS, V. L. V.; PINTO, M. C. F. G.; GUERRA, L. R.; ASENSI, M. D. Carbapenem-hydrolysing betalactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, p. 265-268, 2009.

PÉREZ-PÉREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 2153-2162, 2002.

POETA, P.; RADHOUANI, H.; GONÇALVES, A.; FIGUEIREDO, N.; CARVALHO C.; IGREJAS, G. Genetic characterization of antibiotic resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* carrying extended-spectrum beta-lactamases recovered from diarrhoeic rabbits. **Zoonoses Pub. Health**, v. 57, p. 162-170, 2009.

POPPE, C.; MARTIN, L. C.; GYLES, C. L.; REID-SMITH, R.; BOERLIN, P.; MCEWEN, S. A.; PRESCOTT, J. F.; FORWARD, K. R. Acquisition of resistance to extended spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Newport and *Escherichia coli* in Turkey poult intestinal tract. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 1184-1192, 2005.

RADICE, M.; POWER, P.; DI CONZA, J.; GUTKIND, G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 602-604, 2002.

RODRIGUÉZ-MARTINÉZ, J. M.; VELASCO, C.; PASCUAL, A.; GARCÍA, I.; MARTINÉZ-MARTINÉZ, L. Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three *qnrA*-containing plasmids. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 12, p. 440-445, 2006.

ROSÁRIO, N. A.; GRUMACH, A. S. Allergy to betalactams in pediatrics: a practical approach. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. 181-188, 2006.

SCOGNAMIGLIO, F.; LOVANE, G.; GALIERO, G. Characterization of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from diarrhoeic Mediterranean water buffalo calves (*Bubalus bubalis*). **Res. Vet. Sci.**, v. 93, p. 18-22, 2012.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das beta-lactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 48, p. 91-99, 2012.

SIMÕES, R. R.; POIREL, L.; DA COSTA, P. M.; NORDMANN, P. Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 16, p. 110-112, 2010.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: Freeman 1973. 573 p.

SONG, W.; BAE, I. K.; LEE, Y. N.; LEE, C. H.; LEE, S. H.; JEONG, S. H. Detection of extended-spectrum beta-lactamases by using boronic acid as an AmpC beta-lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 1180-1184, 2007.

SOUGAKOFF, W.; GOUSSARD, S.; COURVALIN, P. The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 56, p. 343-348, 1988.

SOUZA, R. A.; PITONDO-SILVA, A. Multilocus Sequence Typing para identificação de linhagens atípicas de *Yersinia*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador, Bahia **Anais...** Salvador, Bahia, 2008.

STEWART, C. D.; WALLACE, D.; HUBERT, S. K.; LAWTON, R.; FRIDKIN, S. K.; GAYNES, R. P.; MCGOWAN, J. E.; TENEVER, F. C. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: a survey of project ICARE laboratories. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 38, p. 59-67, 2000.

STURENBURG, E.; SOBOTTKA, I.; LAUFS, R.; MACK, D. Evaluation of a new screen agar plate for detection and presumptive identification of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 51, p. 51-55, 2005.

SUN, Y.; ZENG, Z.; CHEN, S.; MA, J.; HE, L.; LIU, Y.; DENG, Y.; LEI, T.; ZHAO, J.; LIU, JH. High prevalence of *bla*_{CTX-M} extended-spectrum β -lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 16, p. 1475-1481, 2010.

TAMANG, M. D.; NAM, H. M.; JANG, G. C.; KIM, S. R.; CHAE, M. H.; JUNG, S. C.; BYUN, J. W.; PARK, Y. H.; LIM, S. K. Molecular characterization of extended-spectrum- β -lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from stray dogs in South Korea. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, p. 2705-2712, 2012.

TARR, P. I. *Escherichia coli* O157:H7: overview of clinical and epidemiological issues. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 632-636, 1994.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 79 p.

TOLLENTINO, F. M.; POLOTTO, M.; NOGUEIRA, M. L.; LINCOPAN, N.; NEVES, P.; MAMIZUKA, E. M.; REMELI, G. A.; De ALMEIDA, M. T.; RÚBIO, F. G.; NOGUEIRA, M. C. High prevalence of *bla* (CTX-M) extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of *bla* (SHV-12), *bla* (SHV-31), *bla* (SHV-38), and *bla* (CTX-M-15) in Brazil. **Microb. Drug. Resist.** v. 17, p. 7-16, 2010.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

VASCONCELOS, F. R. Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, p. 405-410, 2010.

VIGNOLI, R.; VARELA, G.; MOTA M. I.; CORDEIRO, N.F.; POWER, P.; INGOLD, E.; GADEA, P.; SIROK, A.; SCHELOTTO, F.; AYALA, J. A.; GUTKIND, G. Enteropathogenic *Escherichia coli* strains encoding the Per-2 and TEM-116 extended spectrum β -lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 2940-2943, 2005.

WILLIAMS, J. D. betalactamases and betalactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 1, p. 3-7, 1999.

YAMAMOTO, S.; TERA, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 12, p. 85-90, 1995.

YUM, J. H.; KIM, S.; LEE, H.; YONG, D.; LEE, K.; CHO, S. N.; CHONG, Y. Emergence and wide dissemination of CTX-M-type ESBLs, and CMY-2- and DHA-1-type AmpC beta-lactamases in Korean respiratory isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **J. Korean Med. Sci.**, v. 20, p. 961-965, 2005.