LUANA CLAUDINO DE MELO

MICROBIOTA COMENSAL DE ANIMAIS DE COMPANHIA COMO RESERVATÓRIO DE GENES CODIFICADORES DE β-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) E RESISTÊNCIA A QUINOLONAS MEDIADA POR PLASMÍDEOS (PMQR)

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.

São Paulo
2014

LUANA CLAUDINO DE MELO

MICROBIOTA COMENSAL DE ANIMAIS DE COMPANHIA COMO RESERVATÓRIO DE GENES CODIFICADORES DE β-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) E RESISTÊNCIA A QUINOLONAS MEDIADA POR PLASMÍDEOS (PMQR)

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: Profº Drº Nilton Lincopan

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Melo, Luana Claudino.
Microbiota comensal de animais de companhia como reservatório de genes codificadores de enzimas beta-lactamases de espectro estendido e resistência à quinolonas por plasmideos / Luana Claudino Melo. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Nilton Lincopan.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Resistência bacteriana e alternativas terapêuticas.

Versão do título para o inglês: Commensal microbiota of companion animals as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR).

1. Resistência 2. Enterobacteriaceae 3. Cefalosporinas 4. Fluoroquinolonas 5. ESBL 6. Animais de companhia I. Lincopan, Prof. Dr. Nilton II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB086/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Luana Claudino de Melo

Título da Dissertação: Microbiota Comensal de Animais de Companhia como Reservatório de Genes Codificadores de β-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL) e Resistência a Quinolonas Mediada por Plasmídeos (PMQR)

Orientador(a): Prof. Dr. Nilton Lincopan.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovada **( ) Reprovada**

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **071** nas fls. **129** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Nilton H. Lincopan**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Prevalência e identificação de determinantes de resistência as quinolonas/fluoroquinolonas Qnr. Qep. e AAC(6)-1b-cr mediados por plasmídeos em membros da família enterobacteríaeeae isolados de animais de companhia"* do qual participam o(s) **Luana Claudino de Melo,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **29.05.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 31 de maio de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Nilton Lincopan por me aceitar de braços abertos em seu laboratório, pela confiança na minha capacidade de fazer sempre melhor e principalmente pela oportunidade de desenvolver um projeto diretamente relacionado a duas de minhas grandes paixões: a microbiologia e os animais.

Agradeço ao professor Dr. Antônio Pestana de Castro por acreditar em minha capacidade mesmo quando nem eu acreditava, por me entender e orientar no início de tudo e por se fazer presente mesmo com todas as dificuldades enfrentadas. Tenha a certeza de que sua presença em minha jornada fez toda a diferença.

Agradeço ao senhor Luiz Fernando Guerra- que infelizmente não está mais entre nós - e sua esposa, pela disponibilidade em nos ajudar e pelo trabalho incrível que realizam com animais abandonados. Tenho certeza de que seu trabalho ainda não acabou, e os anjos animais estão em festa por compartilharem o céu com um anjo humano tão iluminado.

Agradeço ao Dr. Fernando Hossomi, ao Dr. Hildebrando e Dra. Telma, além de todos os envolvidos no Centro de Zoonoses, e a Fernanda Gonsales pelo auxílio imensurável, ao professor Jorge Sampaio e ao Grupo Fleury pela disponibilidade de equipamentos, à Dra. Ana Gales e à Dra. Milena Dropa pela disponibilidade de cepas-controle e primers, todos indispensáveis para a conclusão do trabalho.

Agradeço muito à Tati, Lucianne, Leandro, Edmar, Quézia, Juan, RodrigoC. e Rodrigo M., Ednei, Micheli, Helena, Matheus, Patrícia, Xila, Priscila, Enyd, Lívia, Lúcia, Vanessa Bueris, Roberta e Jacinta por me proporcionarem muitas risadas e me ajudarem demais em todos os aspectos. Fiz questão de colocar o nome de todos porque vocês são incríveis, amo trabalhar com vocês e me orgulho muito de ser amiga de pessoas tão especiais.

Agradeço imensamente aos meus pais e à minha irmã pelo apoio incondicional, por me levantarem todas as vezes que caí e me lembrarem de meu verdadeiro valor sempre que eu me esquecia, por se despedirem de mim confiantes e depois me acolherem saudosos de minhas empreitadas malucas e principalmente por nunca me permitirem pensar que fosse difícil demais ou que eu não seria capaz. Vocês são minha força e a razão de tudo, e sem vocês não sou absolutamente nada.

Obrigada!

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos, e acima de tudo, importa o que fazemos de nós”.

(Chico Xavier)

RESUMO

MELO, L. C. **Microbiota Comensal de Animais de Companhia como Reservatório de Genes Codificadores de Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL) e Resistência a Quinolonas Mediada por Plasmídeos (PMQR).** 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Animais de companhia podem ser importantes reservatórios de bactérias que produzem β-lactamases de amplo espectro (ESBL) e/ou que expressam um mecanismo de resistência adquirida a quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR). Uma vez que não existem dados sobre esta condição epidemiológica no Brasil, a presente pesquisa visou determinar a prevalência de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL (CTX-M, SHV, TEM) e PMQR (codificado pelos genes *qnr*, *qep*, *aac(6')-1b-cr* e *oqx*) em animais de estimação, investigando o potencial papel destes hospedeiros como portadores assintomáticos. Durante o ano de 2012 foram coletadas 216 amostras (zaragatoas de fezes e saliva) de 108 animais de companhia (29 gatos e 79 cães) abrigados em casas de família, um centro de acolhimento de animais abandonados, e no Centro de Controle de Zoonoses da Cidade de São Paulo. Bactérias Gram-negativas foram isoladas em meios seletivos sendo identificadas por métodos bioquímicos convencionais e MALDI-TOF® e estudadas quanto a fenótipos e genótipos de resistência aos antibacterianos quinolonas / fluoroquinolonas (Q/FQ) e β-lactâmicos de amplo espectro, incluindo cefalosporinas e carbapenêmicos. Para as cepas produtoras de ESBL (14 cepas de *E. coli* e 3 cepas de *E. cloacae*) foi investigada a relação clonal. Adicionalmente, para as *E. coli* ESBL positivas foram determinados os grupos filogenéticos de virulência, sendo que especificamente para cepas produtoras de CTX-M-15 foi triada a classificação no sorogrupo O:25 e a determinação do tipo de sequência referente ao MLST. Do total de bactérias Gram-negativas isoladas (n=100), 85% apresentaram fenótipo sugestivo de PMQR; enquanto que 62% dos isolados exibiram um fenótipo característico (*E. coli*= 13, *Enterobacter cloacae*= 3, *Pseudomonas aeruginosa*= 1)e sugestivo (45 cepas) para produção de ESBL, sendo na sua maioria identificadas como *E. coli*. Dentre os isolados que apresentaram perfil fenotípico ESBL, 14 carregaram variantes do gene $bla_{\text{CTX-M}}$, 9 isolados foram positivos para o gene bla_{TEM}, e 6 isolados foram positivos para bla_{SHV}. Em relação às cepas resistentes às Q/FQ, 56% (n= 43) foram positivas para a presença do gene *qnr*, o qual foi identificado em 11 espécies diferentes. Os resultados apresentados merecem especial atenção, uma vez que epidemiologicamente constituem um dado inédito no Brasil, pois mostra que animais de companhia são portadores assintomáticos de cepas produtoras de ESBL e PMQR. Por outro lado, animais de companhia poderiam ser colonizados por cepas de origem humana. Bactérias que fazem parte da microbiota comensal podem ter um papel importante na disseminação de genes de resistência aos antibacterianos. Nesta condição, o hospedeiro colonizado pode ser um portador assintomático que contribui com a disseminação do agente bacteriano para outros hospedeiros e/ou ecossistemas associados, ou em uma condição desfavorável o hospedeiro pode adquirir uma infecção endógena, com prognóstico desfavorável decorrente da falha terapêutica mediada pela expressão de genes de resistência para antibacterianos considerados de última escolha terapêutica.

Palavras-chave: Resistência antibacteriana. Enterobacteriaceae. Cefalosporinas. Fluoroquinolonas. *Escherichia coli*. ESBL. CTX-M. *Qnr*. Animais de Companhia.

ABSTRACT

MELO, L. C. **Commensal Microbiota of Companion Animals as Reservoirs of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Genes.** 2014. 84 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Pets may be important reservoirs for bacteria that produce β -lactamase broad spectrum (ESBLs) and / or that express a mechanism of acquired resistance to quinolones plasmid-encoded (PMQR). Since there are no data on this epidemiological conditions in Brazil , the present study aimed to determine the prevalence of Gram-negative bacteria producing ESBL (CTX -M, SHV, TEM) and PMQR (encoded by *qnr*, *qepA*, *aac (6 ') - 1b - cr* and *oqx* genes) in pets, investigating the potential role of these hosts as asymptomatic carriers. During 2012, 216 samples (feces and saliva swabs) from 108 pet animals (29 cats and 79 dogs) housed in shelters or a Zoonosis Control Center were collected from São Paulo city. Gram-negative bacteria were isolated on selective media and identified by conventional biochemical methods and MALDI -TOF®. The phenotypes and genotypes patterns for resistance to quinolones/fluoroquinolones (Q/FQ) and β -lactam broad-spectrum antibacterials, including cephalosporins and carbapenems also were performed. For ESBL-producing strains (14 *E. coli* and 3 *E. cloacae*) the clonal relationship were investigated by ERIC-PCR. Additionally, for ESBL-positive *E. coli* the phylogenetic groups were determined by Clermont method. For strains producing CTX-M-15 enzymes were also screened for serogroup O:25, and then these strains were analyzed by MLST. Of the total Gram-negative bacteria isolated (n = 100), 85 % showed suggestive PMQR phenotype; while 62 % of the isolates exhibited a characteristic phenotype (*E. coli* = 13, *Enterobacter cloacae* = 3, *Pseudomonas aeruginosa* = 1) and suggestive (45 strains) for ESBL-producing, with the most identified as *E. coli*. Among the isolates exhibiting phenotypic profile ESBL 14 carried variants $bla_{\text{CTX -M}}$ gene, 9 isolates were positive for bla_{TEM} gene, and6 isolates were positive for bla_{SHV}. Regarding resistant Q/FQ isolates, 56% (n = 43) were positive for the *qnr* gene, which was identified on 11 different species. These results showed a first-time epidemiological data in Brazil, which indicate that companion animals are asymptomatic carriers of ESBL producing strains and PMQR. These colonized hosts may contribute to the spread of bacterial agent to other hosts and /or associated ecosystems, causing an antibacterial treatment failure. In an unfavorable condition the host can acquire an endogenous infection due to treatment failure mediated by the expression of genes for resistance to antibacterial therapy, generally considered for last choice.

Keywords: Antibiotic resistance. Enterobacteriaceae. Cephalosporins. Fluoroquinolones. *Escherichia coli*. ESBL. CTX-M. *Qnr*. Companion Animals.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1. Representação dos principais reservatórios (digestivos e ambientais) de bactérias produtoras de enzimas β-lactamases, as quais os humanos e animais estão expostos e suscetíveis a uma transmissão cruzada. As setas mostram as transições de cepas ESBL entre os reservatórios, permitindo a troca de material genético entre cepas ambientais e digestivas (adaptado de WOERTHER et al., 2013). 17

Figura 2. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias. 21

Figura 3. Diagrama esquemático da classificação de Ambler (adaptado de HALL et al., 2005). 23

Figura 4. Panorama atual da resistência aos β-lactâmicos mediada por plasmídeos, no Brasil (Fonte: LINCOPAN, 2010). 26

Figura 5. Panorama atual da resistência às quinolonas / fluoroquinolonas mediada por plasmídeos, no Brasil (Fonte: LINCOPAN, 2012). 30

Figura 6, Figura 7, Figura 8, Figura 9. Gatos abrigados em um centro de acolhimento de animais situado no bairro Rio Pequeno, onde foram realizadas algumas das coletas e cães abrigados no Centro de Controle de Zoonoses da Cidade de São Paulo. 43

Figura 10 A e B. Confirmação do fenótipo ESBL por dupla difusão do disco (A) e ChroMagar® ESBL (B), onde observa-se em coloração azul, *Enterobacter cloacae* com fenótipo positivo para produção de β-lactamases. 46

Quadro 1. Isolados recuperados de amostras de fezes e saliva de cães e gatos selecionados por diluição de ciprofloxacina (≥2μg/ml) em Ágar MacConkey,identificados por espécie e caracterizados fenotípica e genotipicamente. 52

Quadro 2. Identificação, origem, valores de concentração inibitória mínima (MIC) a duas classes de antimicrobianos, Cefalosporinas e Fluoroquinolonas, bem como a e caracterização genotípica de cepas multirresistentes (MR) provenientes de cães e gatos abrigados em dois centros de acolhimento de animais abandonados na cidade de São Paulo. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das quinolonas e fluoroquinolonas (LEE et al., 2011): 20
Tabela 2: Histórico da resistência às quinolonas e fluoroquinolonas em bactérias gram-negativas isoladas de amostras clínicas humanas e animais de produção, Brasil 1996 e 2012. 29
Tabela 3: Relação de locais onde foram realizadas as coletas na cidade de São Paulo no ano de 2012: 34
Tabela 4: Sequência de iniciadores para os genes de resistência aos β-lactâmicos ESBL utilizados neste estudo: 38
Tabela 5: Sequência de primers para os genes PMQR utilizados neste estudo..... 39
Tabela 6: Esquema de classificação de filogenia de virulência para *Escherichia coli* (fonte: CLERMONT et al., 2013). 40
Tabela 7: Lista de iniciadores para os genes determinantes dos grupos filogenéticos segundo CLERMONT et al., 2013 e ERIC-PCR:..... 41
Tabela 8: Lista de primers para o MLST (www.pasteur.fr/ mlst/primers_Ecoli): 42
Tabela 9: Comparação de identificações obtidas pelo teste Bactray® e pelo teste de espectrofotometria de massas MALDI-TOF®: 44
Tabela 10: Percentual de resistência aos antimicrobianos do total de 100 isolados de bactérias gram-negativas testadas e selecionadas pela técnica de difusão de disco (Kirby-Bauer). 50
Tabela 11 (A e B): Percentual de resistência (%) aos antimicrobianos das espécies de bactérias Gram-negativas encontradas nas amostras de cães e gatos coletadas em 2012. 51
Tabela 12: Características microbiológicas e epidemiológicas, caracterização fenotípica e genotípica de ESBLem alguns isolados estudados, coletados no ano de 2012. 54
Tabela 13: Cepas com fenótipo negativo para produção de β-lactamases no teste de disco-difusão, mas que apresentaram perfil de resistência na concentração inibitória mínima, e posteriormente foram caracterizadas como portadoras dos genes de produção de β-lactamases: 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC – Amoxilina +Ácido Clavulânico

CTF - Ceftiofur

CTX – Cefotaxima

CAZ – Ceftazidima

ATM – Aztreonam

CIP – Ciprofloxacina

SUT – sulfametoxazol/trimetoprim

PEF – Pefloxacina

ETP – Ertapenem

NAL –Ácido Nalidíxico

NOR – Norfloxacina

ENO – Enrofloxacina

LVX – Levofloxacina

MFX – Moxifloxacina

GEN – Gentamicina

TIG – Tigeciclina

OFX – Ofloxacina

Q/FQ – Quinolonas / Fluoroquinolonas

MIC – Concentração Inibitória Mínima

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

MLST – *Multi Locus Sequence Typing*

Chr® - ChromAgar®

MDR – Multirresistente

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

RPM – Rotações por minuto

Taq – enzima DNA polimerase originada da bactéria *Thermus aquaticus*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 Microbiota oral e intestinal em humanos e outros animais 14
1.2 *Escherichia coli*como microbiota comensal ou agente de infecção 15
1.3 Antimicrobianos e a seleção da microbiota no ambiente 17
1.3.1 Os antibióticos da classe dos β-lactâmicos 18
1.3.2 Os antimicrobianos da classe das Quinolonas / Fluoroquinolonas 19
1.4 Resistência adquirida mediada por plasmídeos 21
1.4.1 A resistência aos β-lactâmicos 22
1.4.2 A resistência bacteriana às quinolonas e fluoroquinolonas 24
1.5 Impacto clinico humano de resistência aos β-lactâmicos e quinolonas / fluoroquinolonas no Brasil e no mundo 25
1.6 O impacto da resistência aos beta-lactâmicos e quinolonas na Medicina Veterinária 30
2 OBJETIVOS 33
2.1 Objetivo geral 33
2.2 Objetivos específicos 33
3 MATERIAIS E MÉTODOS 34
3.1 Isolados e cepas de referência 34
3.2 Identificação das espécies isoladas 35
3.3 Determinações do perfil de sensibilidade: 36
3.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM): 36
3.5 Recuperação e Armazenamento dos isolados de interesse 37
3.6 Extração de DNA para análises moleculares 37
3.7 Testes genotípicos para confirmação de genes PMQR e ESBL 38
3.8 Determinação dos grupos filogenéticos 39
3.9 Técnica de ERIC-PCR 41
3.10 Técnica de Multilocus Sequence Typing – MLST 41
4 RESULTADOS 43
5 DISCUSSÕES 60
6 CONCLUSÕES 64
REFERÊNCIAS 65
APÊNDICES 78

APÊNDICE A - Resumo submetido, aceito e apresentado em forma de pôster noICAAC - Conferência Internacional sobre Agentes Antimicrobianos e Doenças Infecciosas, no ano de 2014, em Denver – Co (EUA): 78
APÊNDICE B -Perfil de Resistência a partir da técnica de disco – difusão de isolados adquiridos de amostras de fezes e saliva de gatos , coletadas em 2012..... 79
APÊNDICE C - Termo de consentimento para a utilização de animais, exigido pelo CEUA-ICB assinados pelos responsáveis aos animais submetidos às coletas no ano de 2012. 81
APÊNDICE D - Termo de consentimento para a utilização de animais, exigido pelo CEUA-ICB assinados pelos responsáveis aos animais submetidos às coletas no ano de 2012. 82
APÊNDICE E - Termo de consentimento para a utilização de animais, exigido pelo CEUA-ICB assinados pelos responsáveis aos animais submetidos às coletas no ano de 2012. 83
APÊNDICE F - Termo de consentimento para a utilização de animais, exigido pelo CEUA-ICB assinados pelos responsáveis aos animais submetidos às coletas no ano de 2012. 84

1 INTRODUÇÃO

A microbiota normal presente nos seres vivos se estabelece como uma relação mútua e/ou comensal entre microrganismos e as diversas regiões do corpo dos hospedeiros onde existe contato com o meio externo (mucosas). Embora a maior parte da microbiota seja estável com relação ao gênero bacteriano, existe uma diversidade de espécies em relação aos sítios de colonização influenciadas pelas características bioquímicas e fisiológicas que regulam o metabolismo respiratório (aeróbio/anaeróbio) e obtenção de energia (fermentador/não fermentador) (SUCHODOLSKI, 2011; TORTORA, 2012). Por outro lado, pode existir uma colonização transitória, dependente do ambiente no qual o hospedeiro se situa, e das espécies microbianas predominantes no momento da interação hospedeiro-ambiente. É importante considerar que indivíduos que compartilham um nicho ecológico são suscetíveis a compartilhar a microbiota residente, principalmente considerando o contato direto e indireto e os hábitos higiênicos e alimentares de alguns animais (FIOCCHI et al., 2012; WEINSTOCK, 2012).

A microbiota normal de um indivíduo é adquirida a partir do nascimento e a característica estável de cada uma pode trazer benefícios como, por exemplo, a proteção contra microrganismos patogênicos, a produção de vitaminas, regulação bioquímica e homeostase (MICENKOVÁ et al., 2014; TORTORA, 2012; TRABULSI, 2008).

1.1 Microbiota oral e intestinal em humanos e outros animais

A microbiota oral dos seres humanos e outros animais é constituída por uma grande variedade de leveduras e bactérias (SANTIN et al., 2013), assim como, a microbiota gastrointestinal. A microbiota intestinal requer atenção especial devido a sua grande quantidade e diversidade de microrganismos, além da constante exposição a numerosas fontes de bactérias do ambiente como água, alimentos, solo e outros animais que convivem simbioticamente (WEINSTOCK, 2012; WELLS et al., 2014; WINTERSDORFF et al., 2014).

O intestino grosso é a região do corpo onde há maior predominância de microrganismos. Dentre as bactérias presentes na microbiota intestinal, encontram-se em grande maioria *Escherichia coli*, *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. Já na microbiota oral, por ser uma região úmida e com presença constante

de alimentos, a predominância bacteriana é de *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Neisseria* spp., entre outros (DONSKEY et al., 2006; TORTORA, 2012).

Em certos tipos de animais a microbiota oral pode estar constituída por espécies microbianas que fazem parte da microbiota intestinal, de forma permanente ou transitória, dependente dos hábitos higiênicos, tipo de alimentação e comportamento e interação social. Por outro lado, tanto a microbiota oral como intestinal pode ser modificada por fatores externos como o uso de antimicrobianos (MARTINS et al., 2012).

A família Enterobacteriaceae é composta por diversos gêneros que fazem parte da microbiota, cujas espécies pertencentes são definidas como bacilos Gram-negativos fermentadores de glicose (e muitos outros açúcares), não produtores de oxidase, produtores de catalase, anaeróbios facultativos, que laboratorialmente se caracterizam por crescer em ágar MacConkey, uma vez que possuem tolerância à inibição pelos sais biliares presentes neste meio (QUINN, 2005).

Alguns membros da família Pseudomonadaceae também se encontram em abundância na microbiota humana e animal, e em algumas circunstancias podem ser patógenos oportunistas, como exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*. São em geral caracterizados por serem Gram-negativos não fermentadores de glicose, aeróbios obrigatórios, catalase positiva e por possuírem mobilidade por flagelo polar (QUINN, 2005; VALADBEIGI et al., 2014).

1.2 *Escherichia coli*como microbiota comensal ou agente de infecção

A família Enterobacteriaceae é constituída por uma extensa gama de gêneros de interesse clínico humano e veterinário, cujas patologias associadas dependem do tipo de fator de virulência que pode ser expresso, como: proteínas de adesão, cápsula, endotoxina e exotoxinas, entre outros (MURRAY, 2006; TRABULSI, 2004). Assim, algumas espécies são prevalentes em processos infecciosos específicos, como por exemplo, *Klebsiella pneumoniae* em pneumonia hospitalar (GALES et al., 2012; XUE et al., 2014) e *E. coli* em infecção urinária (OSUGUI et al., 2014).

Especificamente, *E. coli* tem sido um exemplo de versatilidade. Dependendo do seu contexto genético, cada membro desta esta espécie bacteriana pode ser comensal (não virulenta) ou patogênico, e mesmo que evolutivamente uma determinada cepa não seja virulenta, existe a possibilidade de chegar a adquirir fatores de virulência, tornando-se patogênica. Dependendo também da condição imunológica do hospedeiro, uma própria cepa comensal pode ser oportunista, tendo como exemplo a infecção urinária de origem endógena

em pacientes idosos, crianças ou que apresentam neoplasias. Desta forma cepas essa espécie pode ser especificamente patogênica para um determinado hospedeiro, como é o caso de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), a qual produz uma toxina tipo shiga que afeta o ser humano e outros animais, caracterizando um patógeno zoonótico que curiosamente pode ser parte da microbiota de bovinos que são assintomáticos (MICENKOVÁ et al., 2014; WELLS et al., 2014).

Assim, cepas *Escherichia coli* presentes na microbiota têm grande destaque pela possibilidade de causar doenças como diarreia ou até mesmo infecções graves no trato urinário a partir de fatores de virulência expressados por genes cromossomais e plasmidiais. Estes fatores de virulência podem ser adquiridos num ambiente seletivo com a presença de outros organismos, como a microbiota de humanos e animais. Baseado nestes fatores, esse tipo de cepa possui uma diferenciação e caracterização a partir do mecanismo de infecção determinado. As estirpes virulentas podem ser definidas como patótipos enterotoxigênicos (ETEC), enteroinvasores (EIEC), enteropatogênicos (EPEC), responsáveis por infecções do trato urinário (UPEC),*E. coli* de adesão difusa (DAEC), meningite neonatal e septicemia em humanos (EXPEC), como também a cepa citada anteriormente produtora de toxina de Shiga (STEC) ou até mesmo causadora de septicemia (SePEC). Além destes tipos de patótipos são identificados também um tipo de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e uma de extrema importância, a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Os fatores de virulência combinados com a resistência a antimicrobianos tornam-se então um potencial alarmante de epidemiologia de infecções cada vez mais difíceis de encontrar um tratamento (MADIGAN, 2010; MOURA et al., 2009; NAVARRO et al., 1998; TRABULSI, 2004).

Da mesma forma, cepas de *E. coli* presentes da microbiota que se caracterizam por serem suscetíveis aos antibacterianos comercialmente disponíveis, podem chegar a ser resistentes ao sofrerem uma pressão seletiva. O grande paradigma deste evento resume-se ao questionamento sobre a aquisição de determinantes de resistência como um evento genético exclusivo em estirpes não virulentas, uma vez que a aquisição e expressão de genes de resistência por patótipos virulentos demandem um gasto de energia desfavorável. Porém, quebrando esta regra hipotética, patótipos virulentos de *E. coli*, classificados filogeneticamente como B2 e D agentes epidemiológicos já de infecção extra intestinal já caracterizados, têm adquirido genes do tipo ESBL, transformando cepas virulentas em multirresistentes, o que informalmente tem sido denominado “superbactéria” (BLONDEAU, 2013; CHARNOCK et al., 2014; OTEO et al., 2014).

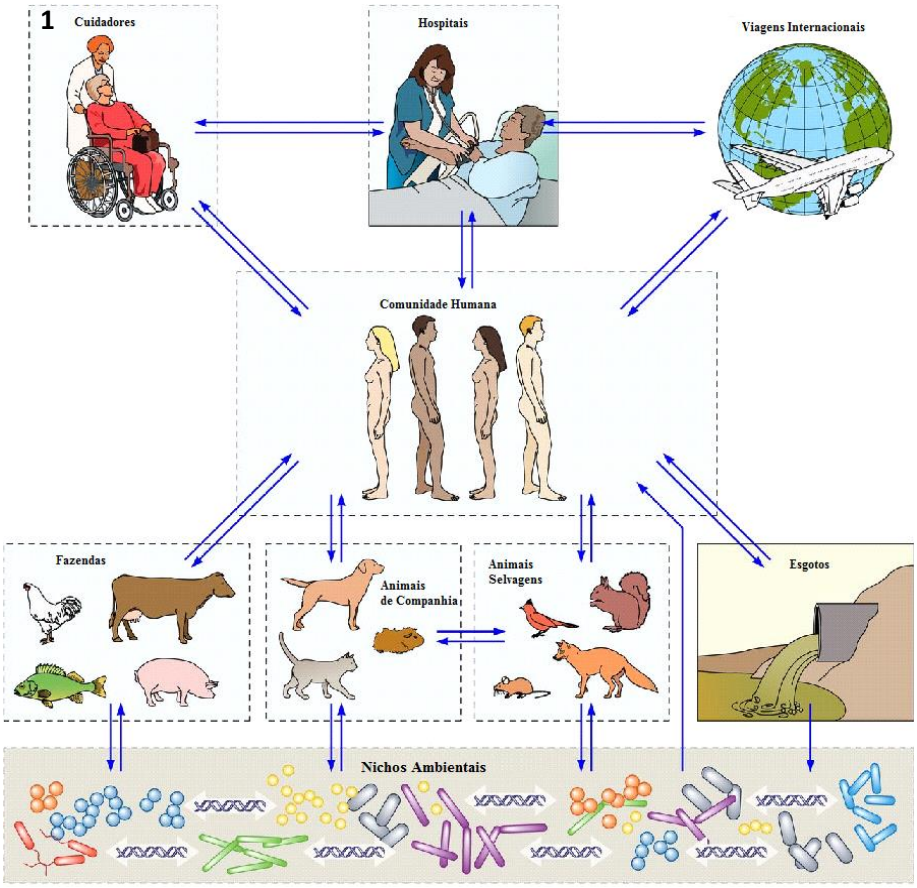


Figura 1 Representação dos principais reservatórios (digestivos e ambientais) de bactérias produtoras de enzimas β-lactamases, as quais os humanos e animais estão expostos e suscetíveis a uma transmissão cruzada. As setas mostram as transições de cepas ESBL entre os reservatórios, permitindo a troca de material genético entre cepas ambientais e digestivas (adaptado de WOERTHER et al., 2013).

1.3 Antimicrobianos e a seleção da microbiota no ambiente

Os agentes antimicrobianos são a principal ferramenta terapêutica para controlar as infecções bacterianas em humanos e animais (PANTOZZI et al., 2010). São classificados de acordo com o mecanismo de ação, estrutura molecular, origem e espectro de atividade. As duas maiores divisões entre os agentes antimicrobianos são de acordo com a origem de produção sintética (químicos) ou natural (antibióticos). A via metabólica dos antimicrobianos depende de suas propriedades químicas, grupos funcionais e até dos átomos em sua estrutura (MANZETTI et al., 2014). Também interferem em diversas vias do metabolismo antimicrobiano, prejudicando vias como a interrupção da síntese da parede celular, rompimento das funções da membrana celular, inibição da síntese de proteínas e interrupção do metabolismo, todos importantes fatores de crescimento e proliferação de microrganismos (BLACK, 1996; MADINGAN, 2010).

Segundo Tortora e colaboradores (2012), os antimicrobianos são classificados conforme a via metabólica de atividade e mecanismo de inibição. Desta forma são classificados e agrupados em: inibidores da síntese de parede celular (penicilinas naturais, penicilinas semissintéticas, cefalosporinas, antibióticos polipeptídeos, antibióticos antimicobacterianos), inibidores da síntese proteica (cloranfenicol, aminoglicosídeos, tetraciclinas, macrolídeos, estreptograminas e oxazolidinonas), prejudiciais à membrana plasmática (Polimixina B), inibidores da síntese de ácidos nucléicos (rifampicina, quinolonas e fluoroquinolonas) e inibidores competitivos da síntese de metabólitos essenciais (sulfonamidas como sulfametoxazol/trimetoprim).

Antibióticos cujos mecanismos de ação são eficazes contra mais de um tipo de microrganismo (em relação a diferentes estruturas fisiológicas) são denominado "antibióticos de amplo-espectro". Esses tipos de antibióticos são muito úteis quando as infecções são causadas por organismos que não podem ser facilmente identificados. No entanto o uso prolongado deste tipo de antibiótico pode causar não só desestabilização das microbiotas normais do corpo, mas também uma pressão seletiva que consequentemente desenvolve uma resistência aos antibióticos mais usados (BLACK et al., 1996). Grande parte da resistência microbiana aos fármacos deve-se a uma modificação genética do agente bacteriano, seja por mutação cromossomal ou aquisição de um plasmídeo ou transposon (LEVINSON et al., 2010).

1.3.1 Os antibióticos da classe dos β-lactâmicos

Os antibióticos β-lactâmicos são amplamente utilizados na medicina veterinária, principalmente nos tratamentos em infecções causadas por *E. coli* em cães e gatos (OKUBO et al., 2014; SHAHEEN et al., 2011). Essa classe de antibióticos teve sua origem a partir da penicilina e sua descoberta por Fleming em 1929. Desde então, muitos outros antimicrobianos naturais foram encontrados, inclusive alguns semi-sintéticos de mesmo mecanismo puderam ser sintetizados (MARTINS et al., 1998). Entre seus componentes incluem-se as penicilinas, as cefalosporinas, as cefamicinas, os monobactâmicos e os carbapenêmicos de importância médica (MADINGAN, 2010). Estes antibióticos têm uso em larga escala na clínica humana e animal e atualmente representam 60% de todo o uso de antimicrobianos para tratamento de diversas infecções, principalmente por Gram-negativos (LIVERMORE et al., 2006).

Os antibióticos desta classe são caracterizados por apresentarem o anel β-lactâmico em sua estrutura química, ligado a uma função ácida, o que confere atividade bactericida de

amplo espectro. Diferenciam-se entre si por pequenas alterações na estrutura que envolve o anel β-lactâmico, mas possuem o mesmo mecanismo de inibição da síntese da parede celular (TORTORA, 2012).

O mecanismo de ação é direcionado à inibição da síntese da parede celular bacteriana através da inibição das transpeptidades, enzimas responsáveis pela formação do peptideoglicano que confere rigidez e resistência a essa estrutura. Essa classe de antibióticos é capaz de ligar-se às transpeptidases de forma irreversível, incapacitando essas enzimas a transportar peptideoglicano e dessa forma descontinuar a transpeptidação. Assim a formação da parede celular é comprometida pelo enfraquecimento da parede celular e a replicação bacteriana, descontinuada (MADIGAN, 2010).

Essa classe de antibióticos é mais utilizada para terapia antimicrobiana exatamente pela eficácia e segurança no tratamento, além da vantagem de sua eficácia e versatilidade química que permite uma constante restauração por manipulação química como nenhuma outra classe existente até o momento. No entanto, o uso exacerbado destes antimicrobianos em diversos tipos de infecções resultou em uma pressão seletiva entre as bactérias patogênicas e comensais através do surgimento da resistência a estes antimicrobianos (BLACK et al., 1996; LIVERMORE et al., 2006).

1.3.2 Os antimicrobianos da classe das Quinolonas / Fluoroquinolonas

As quinolonas são uma classe de agentes antimicrobianos sintéticos (quimioterápicos) frequentemente usados na medicina veterinária e humana desde sua introdução, no fim dos anos 80 e início dos anos 90 (HOOPER et al., 1993). Quinolonas têm uma potente ação contra bactérias Gram-negativas, incluindo *E. coli* (WEBBER et al., 2001).

De acordo com a composição química na sua estrutura dos anéis quinolônicos, as quinolonas se classificam em diferentes grupos (DOMAGALA et al., 1986). Entre as quinolonas encontra-se o ácido nalidíxico e outros compostos com características similares a ele (ex., ácido oxolínico, ácido pipemídico, ácido piromídico, cinoxacin e acroxacin). O ácido nalidíxico ficou conhecido por exercer um efeito bactericida único, pela inibição seletiva da enzima DNA girase ou topoisomerase II, necessária para a replicação do DNA. Embora o ácido nalidíxico tenha sido utilizado de forma limitada (apenas para o tratamento de infecções urinárias), sua manipulação química levou ao desenvolvimento das fluoroquinolonas, na década de 1980 (TORTORA et al., 2012). Este antimicrobiano tem sido usado por muitos

anos na medicina veterinária no tratamento de infecções do trato urinário causada por bacilos Gram-negativos em animais de companhia (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 2006).

As fluoroquinolonas são compostos derivados do ácido nalidíxico – por sua vez derivado da droga antimalárica chloroquine – que diferem deste por conterem um átomo de flúor no anel 6 da molécula, o qual transforma as propriedades destes compostos, amplia seu espectro bacteriano e limita os efeitos adversos (BOLON et al., 2011; HOOPER, 1991; JACKSON et al., 1998). A incorporação da molécula de flúor na posição 6 do anel quinolônico aumentou a afinidade de ligação específica e facilitou a penetração desses agentes na célula bacteriana, proporcionado um importante aumento na potência destes fármacos contra bactérias Gram-negativas, e ampliando o espectro de ação para as Gram-positivas. A primeira quinolona do grupo de fluoroquinolonas foi a norfloxacina, disponibilizada em 1986 (DOMAGALA et al., 1986).

Muitas classificações divergentes das classes de quinolonas e fluoroquinolonas são encontradas na literatura. A mais recente exemplificada por Lee M. e colaboradores em 2011 está disposta na tabela 1:

Tabela 1: Classificação das quinolonas e fluoroquinolonas (LEE et al., 2011):

Geração	Antimicrobiano
Primeira Geração	Ácido Pipemídico Ácido Nalidíxico
Segunda Geração	Norfloxacina Ciprofloxacina Lomefloxacina Ofloxacina Levofloxacina
Terceira Geração	Sparfloxacina Gatifloxacina Grepafloxacina
Quarta Geração	Trovafloxacina Moxifloxacina

As quinolonas interferem na enzima DNA girase impedindo o superenovelamento do DNA na fase de empacotamento na célula bacteriana. São eficazes tanto para bactérias Gram-

negativas quanto Gram-positivas (GAO et al., 2014).Agem pela inibição da topoisomerase II (DNA girase) bacteriana e provavelmente topoisomerase IV em espécies Gram-positivas (BALL et al., 1998; MADIGAN, 2010). A DNA girase foi descoberta em 1976 por Gellert et al. em *Escherichia coli*. A DNA girase introduz superenovelamento negativo no DNA circular, enquanto a topo IV tem como sua principal função a decatenação do DNA durante a segregação dos cromossomos, ambas participando na replicação. Especificamente a DNA girase contém duas subunidades A codificadas pela região denominada *gyrA* do gene, e duas subunidades B, codificadas pela região *gyrB*. A topoisomerase IV apresenta uma estrutura com duas subunidades A e duas B codificadas por *parC* e *parE*, respectivamente (GELLERT et al., 1977; WOLFSON et al., 1985).

As quinolonas agem por interação do corte da dupla fita de DNA (WOLSFSON et al., 1985; YAMANE et al., 2007). Sabe-se que quando o DNA tem interrupções, essas podem atuar como condutoras do processo de exonuclease. Uma vez que as quinolonas fixam-se na girase, podem ampliar as quebras do DNA e convertê-las em aberturas permanentes de dois filamentos, e assim produzem uma inibição na síntese de replicação do DNA bacteriano (HOOPER et al., 1989; JACKSON et al., 1998).

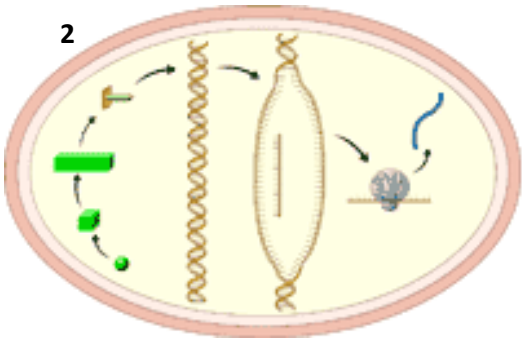


Figura 2. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias (Fonte: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude).

1.4 Resistência adquirida mediada por plasmídeos

A disseminação da resistência bacteriana em cepas virulentas está diretamente relacionada com plasmídeos, elementos genéticos móveis que expressam muitas proteínas benéficas para o funcionamento que também auxiliam na proteção celular (SILVA et al., 2012).

Dentre os genes plasmidiais que codificam proteínas auxiliadoras, encontram-se os genes de resistência aos antimicrobianos. De acordo os objetivos do presente trabalho, foram destacados os perfis de resistência plasmidial das duas já citadas e importantes classes de antibióticos.

Muitos estudos atuais revelam o crescimento mundial e exponencial da resistência a diversos antibióticos a partir de membros das famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae, como o surgimento de genes produtores de enzimas ESBL, resistência aos carbapenêmicos, resistência alarmante à fluoroquinolonas e demais antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções por *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., entre outros (JONG et al., 2011; ROSSI, 2011; SOUZA, 2010; TEO et al., 2012).

1.4.1 A resistência aos β-lactâmicos

A resistência das bactérias aos β-lactâmicos é observada desde o início de 1940. Desta forma a detecção de β-lactamases, tanto em bactérias Gram-positivas, quanto em Gram-negativas não é considerada um fenômeno recente (ABRAHAM, 1940; KIRBY, 1944). Embora a variedade de mecanismos de resistência seja bastante ampla, deve-se destacar a produção dessas enzimas principalmente pela produção de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) em sua maioria presente nas bactérias Gram-negativas pertencentes à família Enterobacteriaceae (MARTINS et al., 2012).

A resistência ocorre pelo resultado da síntese de β-lactamases, enzimas responsáveis pela hidrólise do anel β-lactâmico. Ao serem produzidas, ligam-se aos antibióticos e fazem com que estes percam a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (WILLIAMS et al., 1999). A hidrólise do anel β-lactâmico do núcleo estrutural das penicilinas – o ácido 6-aminopenicilâmico – provoca a formação do ácido penicilóico desprovido de atividade antimicrobiana. As β-lactamases são produzidas tanto por bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, sendo esta última classe portadora de uma quantidade extremamente considerável, de origem cromossômica e plasmidial (SOUZA et al., 2004).

Devido à grande diversidade desse tipo de enzimas, Ambler e colaboradores (1985) realizaram uma classificação que divide β-lactamases em quatro classes (A, B, C e D) com base em cada sequência de aminoácidos sequências de aminoácidos (Figura 3).

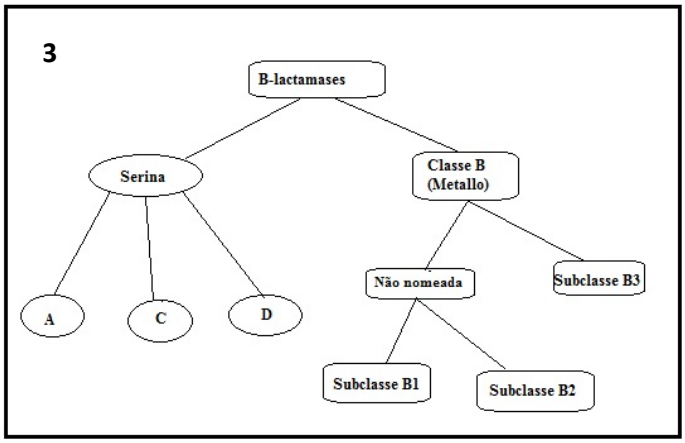


Figura 3. Diagrama esquemático da classificação de Ambler (adaptado de HALL et al., 2005).

Ao longo das décadas, outras classificações foram surgindo devido ao crescimento de novas enzimas atuando na resistência aos β-lactâmicos, bem como a atualização baseada sempre nesta inicial classificação de Ambler. Bush e colaboradores (1995) realizaram uma classificação baseada na característica do substrato.

A resistência aos β-lactâmicos de amplo espectro em membros da família Enterobacteriaceae é causada principalmente pelas β-lactamases de amplo espectro e pela codificação de enzimas cefalosporinases a partir de plasmídeos contendo o gene *Ampc* (SCHLUTER et al., 2014). A resistência derivada da produção de β-lactamases mediada por plasmídeos tem larga difusão entre Gram negativos comuns e patógenos oportunistas (DWIGHT et al., 2009). Devido ao fato de que as cefalosporinas e os carbapenêmicos são os mais utilizados para o tratamento de doenças infecciosas causadas por Gram negativos, a presença e a característica de cada uma dessas enzimas desempenham um papel importante na seleção da terapia apropriada (BUSH et al., 2010).

As Penicilinases TEM e SHV originadas por plasmídeos com uma ou mais substituições de aminoácidos foram as primeiras ESBL. Essas mutações conferem resistência a todos as cefalosporinas, mas não a todas as cefamicinas e carbapenemes. Essa deficiência permitiu um enfraquecimento nestes mecanismos de resistência, enfraquecendo a inativação do anel β-lactâmico (FERNANDES et al., 2014). Até hoje foram documentadas mais de 200variantes das enzimas TEM e SHV.

Dentre as enzimas β-lactamases, destaca-se a emergência de um grupo de β-lactamases de amplo espectro (ESBL – *extended-spectrum β-lactamase*) codificadas por plasmídeos denominadas enzimas CTX-M, encontradas em amostras de populações humanas e animais (EWERS et al., 2010). Já tem sido identificado um número aproximado de 152 variantes

desse tipo de resistência CTX-M, (fonte: Lahey, última visualização: 18/04/2014). Estes dados comprovam a importância da análise desses tipos de resistência em animais de companhia, para identificar o risco epidemiológico de contaminação humano-animal e auxiliar na prevenção de novas variantes e novos tipos de resistência desses antimicrobianos.
A frequência e a diversidade de mecanismos de resistência aos antimicrobianos destas famílias têm mudado nos últimos anos. Por exemplo, até o ano 2000, a maioria das espécies produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) — as quais surgiram em decorrência de mutações em β-lactamases intrínsecas TEM e SHV de espectro restrito —eram *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., isoladas no ambiente hospitalar. Atualmente, as enzimas predominantes em enterobactérias são do tipo CTX-M, presentes em uma grande diversidade de espécies, e deixando de ser restrita aos hospitais uma vez que passaram a ser identificadas em bactérias associadas com infecções comunitárias, principalmente na infecção do trato urinário (LIVERMORE et al., 2007; MINARINI et al., 2007).

1.4.2 A resistência bacteriana às quinolonas e fluoroquinolonas

O uso extensivo e excessivo de quinolonas na medicação clínica humana e veterinária estimula a propagação de patógenos resistentes aos antibióticos usados (ZAO et al., 2012). Entre os fatores cruciais para o desenvolvimento de resistência incluem-se a administração de doses inadequadas, interações reduzindo a biodisponibilidade (por exemplo, a administração concomitante de cátions divalentes), o tratamento de infecções de prótese prolongada e/ou prescrição repetida em pacientes com fibrose cística e amplo uso na prática veterinária e zootecnia (BALL et al., 1994).

Os mecanismos moleculares da resistência à quinolonas envolvem tanto mutação cromossomal quanto resistência mediada por plasmídeos adquiridos (PMQR). Mutações cromossômicas na girase e topoisomerase do tipo IV, proteínas de membrana externa, alterações na expressão de proteínas da membrana externa em espécies Gram-positivos e por variações na captação ou expulsão por bomba de efluxode membrana e outras proteínas reguladoras podem reduzir a afinidade de quinolonas aos seus alvos ou reduzir a acumulação de quinolonas no interior das células bacterianas (BALL et al.,1998; GOOTZ et al., 1996; HOOPER et al., 2001; YAMANEet al., 2007).

A resistência de origem plasmidial ao grupo das quinolonas foi descoberta inadvertidamente durante um estudo das propriedades de um plasmídeo, *pMG252*, que confere resistência ampla para β-lactâmicos. O plasmídeo veio a partir de uma estirpe de *K.*

pneumoniae resistente à ciprofloxacina (estirpe UAB1) isolada em Julho de 1994, a partir da urina de um paciente na Universidade do Alabama (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 1998).

Até 1998 os mecanismos de resistência às quinolonas eram todos de origem cromossonal (KORZENIEWSKA et al., 2013). Desde então muitos estudos foram realizados para comprovar a possibilidade da transferência da resistência às quinolonas e fluoroquinolonas por plasmídeos carregando genes identificados como *qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS, aac(6')-1b, qepA e oqx.* A resistência plasmidial mais conhecida é a mediada por genes *qnr* (NAVARRO et al, 2010). Os genes *qnr* conferem resistência às Q/FQ por inibição alostérica das regiões onde esses antimicrobianos agem nas enzimas girase e topoisomerase IV (CAVACO et al., 2009; WANG et al., 2009; YAMANE et al., 2007).

Alguns mecanismos de resistência divergentes foram descobertos recentemente e têm sido relatados com frequência: o gene *aac(6')-1b-cr*, que codifica uma enzima que inativa a ação de aminoglicosídeos, onde passou a inativar a ação de quinolonas, e os genes *qepA* e *oqxAB*, responsáveis pela produção de proteínas formadoras de complexo de bombas de efluxo, que por sua vez expulsam o antibiótico de dentro da célula bacteriana (NAVARRO, 2010).

Nos dias de hoje o mecanismo mais comum de resistência é o plasmidial através de transferência dos plasmídeos por contato direto ou no ambiente (FONTES et al., 2011).

1.5 Impacto clinico humano de resistência aos β-lactâmicos e quinolonas / fluoroquinolonas no Brasil e no mundo

No Brasil, a produção de ESBL em Enterobacteriaceae também é alarmante, uma vez que variantes do tipo TEM, SHV, CTX-M, OXA, BES, GES, VEB e PER têm sido descritas (POLOTO et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2013). Infelizmente, não existem programas de vigilância de abrangência nacional referente à resistência bacteriana e a seus mecanismos, tornando-se difícil estimar a proporção de produtores de ESBL no país. Ainda de acordo com a família CTX-M, as ESBLs mais frequentemente identificadas em isolados clínicos em território brasileiro incluem os grupos CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9 (CHAGAS et al., 2012; CLÍMACO et al., 2010; SILVA;LINCOPAN, 2012), sendo que recentemente novas variantes como CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-28 e CTX-M-59, começaram a ser identificadas em enterobactérias (BUENO et al., 2013; CERGOLE-NOVELLA et al., 2010; LOPES et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2013; PEIRANO et al., 2011; QUEIROZ et al., 2012; TOLLENTINO et al., 2011).

Um estudo recente de Ferreira e colaboradores (2014) relatou a presença de cepas de *E. coli* portadoras do gene mediador da enzima CTX-M-2 em cortes de frango prontos para consumo humano no estado de São Paulo, Brasil, o que evidencia o risco da aplicação de antibióticos em fazendas de criação de frangos e bois para consumo.

4

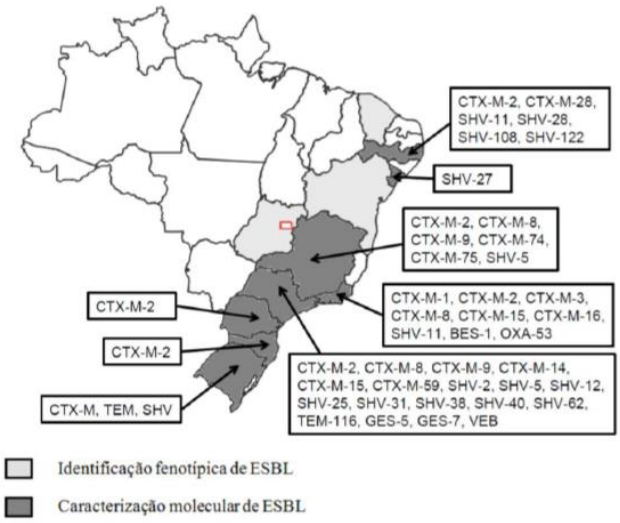


Figura 4. Panorama atual da resistência aos β-lactâmicos mediada por plasmídeos, no Brasil (Fonte: LINCOPAN, 2010).

A América do Sul exibe um dos mais altos índices de resistência antimicrobiana em Enterobacteriaceae de todo o planeta (BONELLI et al., 2014), mas não está isolada. A primeira β-lactamase mediada por plasmídeo em bactérias gram-negativas documentada foi TEM-1, descrita na Grécia no início dos anos 1960. Em seguida foi registrado o surgimento da enzima SHV-1, encontrada *K. pneumoniae* em 1987 (PEYMANI et al., 2014; TZOUVELEKIS et al., 1999).

A emergência de β-lactamases do tipo CTX-M ocorreu quase simultaneamente na Europa e na América do Sul no fim dos anos 80 (BAUERNFEIND et al., 1996), assim como as β-lactamases de espectro estendido em Enterobacteriaceae tiveram o primeiro relato na Europa. Desde então muitos estudos comprovam a rápida disseminação desse tipo de enzima em enterobactérias em todo o mundo (TANSARLI et al., 2013).

Um estudo recente feito por Mavroidi e colaboradores (2014) identificou o primeiro relato da produção da enzima SHV em espécies de *Klebsiella pneumoniae* colonizadas em recém-nascidos na Grécia. Neste mesmo ano um estudo feito por Souna et al. na Algéria concluiu a caracterização das enzimas CTX-M, TEM, SHV e CMY-2 em pacientes de um hospital local, assim como em Portugal, onde pesquisas apresentaram um crescimento exponencial da resistência aos β-lactâmicos através da enzima CTX-M em *E. coli*, *Klebsiella*

spp., *Enterobacter aerogenes* e *Citrobacter freundii*, todos isolados clínicos de pacientes de um hospital local (FERNANDES et al., 2014).

O continente africano também está presente no prospecto gradativo desse tipo de disseminação. Giannoula Tansarli e colaboradores em 2013 reuniram pesquisas de 13 países africanos para realizar uma perspectiva da disseminação de enzimas β-lactamases de espectro estendido na África. Num conjunto de análises de dados das pesquisas em questão, 15% em 16 num total de 26 estudos confirmaram a presença deste tipo de enzima em isolados clínicos de infecções de diversas origens, além do crescimento numa proporção exponencial a cada ano de casos de infecções decorrentes da produção deste tipo de enzima.

Um estudo feito por Peymani e colaboradores em 2014 apresentou o primeiro relato da emergência de enzimas TEM-169, SHV-12 e CTX-M-15 em cepas de *Enterobacter cloacae* em isolados clínicos de hospitais nas cidades de Tehran e Qazvin, no Iran. Relatos também foram documentados na Tailândia, Vietnam e Malásia de cepas portadores dos genes bla_{CTX} e bla_{SHV} pertencentes à família Enterobacteriaceae em amostras de ervas aromáticas, confirmando a disseminação dessas cepas também em alimentos comercializados e exportados por todo o mundo (VELDMAN et al., 2014).

Muitas outras pesquisas já publicadas e/ou em vias de publicação apontam o rápido surgimento, crescimento e disseminação de enzimas β-lactamases, principalmente das variantes de CTX-M em diversas partes do mundo, apresentando um grande risco à saúde e ao tratamento de infecções em humanos e animais.

Desde 1990 até hoje, diversos estudos realizados no Brasil mostram um alarmante crescimento da resistência às quinolonas e fluoroquinolonas em membros da família *Enterobacteriaceae* (Tabela 2), em sua maioria isolados de pacientes desde hospitais em diferentes regiões do país, porém, a emergência de isolados resistentes recuperados desde pacientes da comunidade também tem sido relatada (MINARINI et al., 2007, 2008).

Com relação às PMQR, um estudo feito por Castanheira et al. (2006) em São Paulo identificou pela primeira vez no Brasil a presença da resistência mediada pelo gene*qnrA1* em cepas nosocomiais de *Escherichia coli*.

Em 2007, Minarini e colegas identificaram o gene *qnrB* em cepas de *E. coli, K. pneumoniae e C.freundii* recuperadas a partir de infecções do trato urinário.

Já Peirano e colaboradores (2010) identificaram os genes *qnrB* e *aac(6')-Ib-cr* em cepas de *E. coli* resistentes à ciprofloxacina em amostras provenientes de hospitais do Rio de Janeiro.

O primeiro relato dos genes de resistência plasmidial *qnrB19*, *qnrS1* e *aac(6')-Ib-cr* no Brasil ocorreu recentemente em Belo Horizonte (MG) no ano de 2012 por Paiva e colaboradores. Os genes estavam presentes em cepas de *E. coli* recuperadas de amostras clínicas de urinas de mulheres em um centro laboratorial pertencente à unidade de terapia intensiva de um hospital local, e totalizaram 8% de presença nos 101 isolados analisados no trabalho. No ano seguinte Viana et al. (2013) identificou não só a presença de genes de resistência plasmidial às Q/FQ, mas uma coexistência destes genes com genes de resistência aos β-lactâmicos em estirpes de plasmídeos em membros da família Enterobacteriaceae.

Tabela 2: Histórico da resistência às quinolonas e fluoroquinolonas em bactérias gram-negativas isoladas de amostras clínicas humanas e animais de produção, Brasil 1996 e 2012.

REGIÃO	ESPÉCIE/FAMÍLIA	RESULTADO ENCONTRADO	AUTOR	ANO
RS	*Samonella Hadar*	86,6% ácido nalidíxico	RIBEIRO et al.,	1996
BA	*Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp.	Aumento da resistência à norfloxacina e Ciprofloxacina	LOPES et al.,	1998
SP, RJ, SC (além de outros países)	*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. Mirabilis*	Mutações em *gyrA* e *parC*, nível alto de resistência à ciprofloxacina e às novas quinolonas	GALES et al.,	2000
AM	*N. gonorrhoeae*	9,7% resistência à ciprofloxacina	FERREIRA et al.,	2004
PB	*P. aeruginosa*	50,3% resistência à ciprofloxacina	FIGUEIREDO et al.,	2006
Diversos Estados	*E. coli*	Presença de*qnrA1*	CASTANHEIRA et al.,	2007
MG	*E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*	Presença de *qnrB*	MINARINI et al.,	2007
BA, MG, DF, CE, MA, PR, RS, SC, SP	*E. coli*	Aumento da resistência às quinolonas e presença do gene*Qnr*	PEREIRA et al.,	2007
Diversos Estados	*Vibriocholerae*	Presença de *qnrVC1*, *qnrVC2*	FONSECAet al.,	2008
CE	*E. coli*	Resistências: 9,3% ácido nalidixíco e 4,7% ciprofloxacina	VASCONCELOS et al.,	2010
RJ	*E. coli*	Resistência: 92% CIP, presença: 44% *aac(6')-Ib-cr*; 16% *qnrB*	PEIRANO et al.,	2011
PR	*Salmonella entérica*	88.8% ácido nalidíxico e 23.01% para ciprofloxacina (*qnrA1*, *qnrB19*)	FERRARI Ret al.,	2011
SP	Enterobacteriaceae	7% presença dos genes *qnr-like*	FONTES L et al.,	2012
MG	*E. coli*	Genes PMQR *qnrB19*, *qnrS1* e *aac(6')-Ib-cr*, primeiro relato	PAIVA, M et al.,	2012
SP	Enterobacteriaceae	13% presença de genes PMQR – coexistência de gene ESBL	VIANA et al.,	2013

RS: Rio Grande do Sul; BA: Bahia; SP: São Paulo; RJ: Rio de Janeiro; SC: Santa Catarina; AM: Amazonas; PB: Pernambuco; MG: Minas Gerais; DF: Distrito Federal; MA: Maranhão.

5

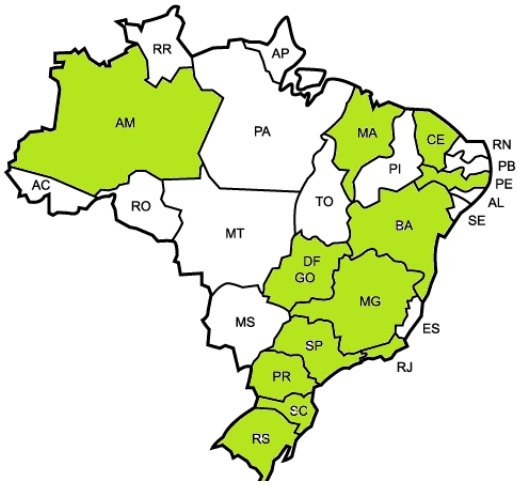


Figura 5. Panorama atual da resistência às Q/FQ mediada por plasmídeos, no Brasil (Fonte: LINCOPAN, 2012).

Evidências indiretas comprovam que a resistência às quinolonas está emergindo entre a população de animais de companhia tratados com esse antibiótico e essas bactérias podem afetar a saúde e o sucesso do tratamento humano. *Campylobacter* spp. era em 1993 a bactéria mais resistente às quinolonas. A partir de 1987 estudos comprovaram que a resistência bacteriana cresceu exponencialmente até os dias de hoje. Isso se deve à liberação do uso da enrofloxacina em pequenos animais para o tratamento de diversas infecções (BLONDEAU et al., 2012; GREENE et al.,1993).

Em um recente estudo feito por Diwan *V.* et al. (2012) com resistência de *E. coli* aos antibióticos mais aplicados, constatou-se que dentre as cepas resistentes, a maioria possuía o gene *qnr* e suas variantes (*qnrA, qnrB*), genes *qepA* e *aac(6')-Ib-cr*, comprovando uma alarmante resistência às quinolonas e fluoroquinolonas na Índia.

A resistência bacteriana aos antibióticos Q/FQ é gradativa a cada ano e tem um impacto mundial alarmante, principalmente em relação aos animais de companhia, uma vez que este tipo de antimicrobiano é largamente utilizado para diversos tipos de infecção na medicina veterinária (GUTIÉRREZ et al., 2001; SHLUTER et al., 2014).

1.6 O impacto da resistência aos beta-lactâmicos e quinolonas na Medicina Veterinária

A aplicação do tratamento com antibióticos para quaisquer tipos de infecções tem crescido com o desenvolvimento da medicina (MURRAY et al., 2006). Em contrapartida, a despeito da rapidez com a qual novos agentes antibacterianos são descobertos, as bactérias demonstraram uma notável habilidade de desenvolver resistência a esses agentes. Bacilos

Gram-negativos têm uma propensão especial para desenvolver e adquirir resistência aos antimicrobianos múltiplos. A pesquisa de novos antibióticos tem sido abandonada frente à alta crise de endemicidade de bactérias resistentes, e até mesmo novos antibióticos têm fracassado antes de serem comercializados (CASTANHEIRA et al., 2008; GALES et al., 2011).

A resistência bacteriana não está restrita apenas à clínica humana, nem cresce de maneira isolada no mundo. Apesar de existirem poucos estudos nesta área, pode-se observar um grande crescimento de cepas resistentes em fazendas de criação de animais pra corte (bois, frangos, peixes) como também em animais selvagens e animais de companhia. Estes animais acabam agindo como reservatórios de cepas resistentes, que podem entrar em contato livre direto ou indireto com o humano e realizar uma contaminação transitória e recorrente (SILVA et al., 2012). No Brasil, trabalhos que caracterizem os mecanismos moleculares de resistência à quinolonas e fluoroquinolonas em enterobactérias de importância Médica Veterinária são restritos a animais de criação. De fato, Ferrari e colegas (2011) reportaram a presença de genes *qnrA1* e *qnrB19* em *Salmonella* spp., recuperados de cepas encontradas em avicultura.

As zoonoses são doenças de origem animal transmissíveis aos seres humanos. Os seres humanos são normalmente hospedeiros acidentais que adquirem as doenças através do contato próximo com um animal infectado, que pode ou não ser sintomático, assim como os animais podem adquirir essas doenças dos humanos (SABRY et al., 2013).

Desta forma, o crescimento da resistência aos β-lactâmicos tem se tornado um problema mundial, não só em relação à epidemiologia humana, mas animal e principalmente entre animais de companhia (OKUBO et al., 2014).No Brasil, não existem estudos epidemiológicos sobre a prevalência de genes de resistência que conferem o fenótipo ESBL ou PMQR em bactérias Gram-negativas recuperadas da microbiota e/ou de processos infecciosos em animais de companhia como cães e gatos. Assim, este tipo de estudo em digno de investigação a partir do fato de que um animal de companhia pode vir a se tornar um importante veículo/fonte de contaminação e disseminação para o ser humano, outros animais e/ou ecossistemas associados, assim como a transmissão contrária de humano para animal.

O impacto ambiental de resistência às quinolonas / fluoroquinolonas, mediante a presença dos genes *qnr*, foi investigado pelo nosso grupo resultando em dados inéditos sobre a presença e disseminação desses genes em rios urbanos de SP, o que reflete nas pesquisas de resistência antimicrobiana e na atual antibioticoterapia, alertando sobre a importância de estudos de vigilância que identifiquem fontes potenciais. De fato, ambientes aquáticos urbanos tem sido contaminados muito provavelmente por atividades antropogênicas, transformando tais ambientes em fontes de disseminação para ecossistemas (FONTES et al.,

2011), principalmente em relação aos animais presentes no ambiente que entram em contato com os ambientes contaminados.

A resistência bacteriana em geral pode ser transferida por mecanismos diversos, podendo estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações, como da microbiota bacteriana animal para humana e vice-versa (NIJSTEN et al., 1993).Um estudo realizado por Villa L.M. e colaboradores em dezembro de 2013 relata uma taxa alta de resistência aos antibióticos por *Pseudomonas* spp. Nos isolados coletados em unidades de terapia intensiva (UTI), houve uma resistência total aos antibióticos de interesse no trabalho, como: aztreonam, cefepime, ceftazidima, imipenem, meropenem e piperacilina / tazobactam. Este resultado, bem como a maioria dos estudos nesta linha de pesquisa, mostra um crescimento gradativo da resistência em bactérias patogênicas presentes na microbiota normal de humanos e animais.

Da mesma forma que a resistência aos antimicrobianos tem aumentado rapidamente nos últimos anos no Brasil e no mundo, gerando a necessidade crescente do conhecimento do perfil de sensibilidade das bactérias que mais frequentemente causam infecções e do modo de disseminação da resistência na clínica médica humana (MARTINS et al., 2013), na medicina veterinária a situação não é diferente. Em um estudo feito em 2014 por Donati V. e colaboradores, foi reportado um número considerável de cepas de *Klebsiella* spp. multirresistentes, apresentando um genótipo confirmatório para os genes ESBL, PMQR e AmpC, coletadas em necropsias de cães e gatos que faleceram por causas infecciosas desconhecidas. Outro estudo muito recente em Paris publicado por Schluter e colaboradores (2014) apresentou a presença do plasmídeo *pENVA* transportando estirpes dos genes $bla_{\text{CTX-M-15}}$, além de uma grande variedade de genes que codificam enzimas de resistência a antibióticos como aminoglicosídeos, tetraciclinas e fluoroquinolonas, o que representa um grande fator de atenção para a transferência ambiental destes genes para outros animais como animais de corte para alimentação e seres humanos, interferindo na terapia antimicrobiana existente na atualidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar e determinar a prevalência de bactérias Gram-negativas com perfil de resistência aos β-lactâmicos de amplo espectro, além de quinolonas / fluoroquinolonas e seus principais genótipos ESBL e PMQR em bactérias Gram-negativas presentes na microbiota comensal de animais de companhia da cidade de São Paulo.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar bactérias Gram-negativas com perfil de resistência aos β-lactâmicos de amplo espectro e quinolonas / fluoroquinolonas em amostras de fezes e saliva de animais de companhia saudáveis (cães e gatos);
- traçar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana nas cepas isoladas;
- determinar quantitativamente (CIM) a resistência a diferentes quinolonas / fluoroquinolonas e identificar os principais genótipos PMQR (genes *qnrA, qnrB, qnrD, qnrS, qepA, aac(6')-1b-cr,oqxA, oqxB*) associados;
- determinar quantitativamente (CIM) a resistência a diferentes β-lactâmicos de amplo espectro (cefalosporinas e carbapenêmicos) e identificar os principais genótipos ESBL ($bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{SHV}, bla_{TEM}) associados;
- definir o grupo filogenético de virulência em isolados de *Escherichia coli* produtoras de β-lactamases;
- identificar os principais genótipos ESBL e PMQR dos isolados selecionados;
- traçar o perfil de similaridade entre as principais espécies produtoras de ESBL por ERIC-PCR;
- caracterizar o complexo clonal por "*Multilocus Sequence Typing*" (MLST) para determinar a origem ancestral e similaridade das cepas pertencentes à família Enterobacteriaceae portadoras dos genes codificadores de β-lactamases do tipo $bla_{\text{CTX-M-15}}$ com sorogrupo O:25.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolados e cepas de referência

Foram coletadas 216 amostras de fezes e saliva com zaragatoa, sendo 58 provenientes de gatos da comunidade, além de um centro de acolhimento de animais abandonados no bairro do Rio Pequeno e 158 de cães do Centro de Controle de Zoonoses, todos da Cidade de São Paulo (Tabela 3). A coleta foi realizada com leve contenção de cada animal pelos veterinários responsáveis em cada local. Foram coletadas amostras da região perianal e bucal, de fezes e saliva, respectivamente, com zaragatoa estéril. As amostras foram mantidas em meio AMIES® (Citotest Labware, Jiangsu – 2013), e posteriormente isoladas em placa de Ágar MacConkey contendo Ácido Nalidíxico (16 µg/mL) e placa de Ágar MacConkey contendo Ceftriaxona (2 µg/mL), todos em estufa com temperatura ambiente de 36°C por 24 horas para a seleção de bactérias Gram-negativas resistentes aos antibióticos em questão. Durante a segunda coleta de amostras, foi optado por mudar o antibiótico de seleção no meio por Ciprofloxacina (2µg/ml) para uma seleção mais exata de bactérias portadoras de genes PMQR.

Tabela 3: Relação de locais onde foram realizadas as coletas na cidade de São Paulo no ano de 2012:

Local da Coleta	Mês da Coleta	Coordenadas do Local
Residência particular 1	Março	-23.553879S, -46.648089O
Residência particular 2	Março	-23.554113S, -46.648257O
Residência particular 3	Março	-23.573888S, -46.738698O
Centro particular de acolhimento de animais no Bairro do Rio Pequeno	Junho	-23.548564S, -46.762228O
Centro de Controle de Zoonoses de Cidade de São Paulo	Julho Novembro	-23.511555S, -46.627258O

3.2 Identificação das espécies isoladas

Os isolados encontrados foram verificados quanto à viabilidade e pureza, além da identificação de espécie pelo teste bioquímico Bactray® (LaborClin, 2012) e posteriormente submetidas ao teste de viabilidade de proteínas MALDI-TOF® (Bruker Daltonik, Bremen, 2002) no laboratório Fleury, para confirmação de isolados devido à grande diversidade de bactérias encontradas.

A identificação pelo teste Bactray® foi realizada da seguinte forma: após isolamento de colônias em Ágar BHI, Muller Hinton ou Luria-Bertani, as colônias foram identificadas quanto à produção de oxidase. Os isolados oxidase-positivos foram direcionados ao kit de reações do Bactray® de número 3, diluídos em água estéril no limite 0,5 da escala de Mc Farland. Em seguida 50 µl desta diluição foi disposta em cada poço do kit, contendo reativos e açúcares específicos para identificação de espécies (como um teste bioquímico usual). Duas gotas de óleo mineral foram dispensadas em determinados poços para que a presença do oxigênio não interferisse na reação bioquímica esperada. As placas foram então colocadas na estufa com temperatura de 36 °C por 24 horas. Para leitura dos resultados foi utilizado o programa de identificação Bactray®, que analisou os isolados quanto aos resultados de reação positiva ou negativa para cada poço do kit. Para os isolados oxidase-negativos foram utilizados os kits de Bactray® de número 1 e 2 (para confirmação), que seguiram o mesmo procedimento do kit número 3.

A identificação por MALDI-TOF® (Matrix Associated Laser Disruption-Ionization - Time of Flight) é um teste de espectrometria de massas baseado no resultado a partir das variações das impressões digitais espectrais entre microrganismos, onde a espécie bacteriana é identificada pelas moléculas de proteínas captadas pelo aparelho (CARBONELLE et al., 2011). Os isolados foram isolados em Ágar Muller Hinton e apenas uma colônia foi acrescentada no poço da placa metálica do aparelho. Em seguida foi acrescentada uma matriz composta de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmicopara promover a liberação das proteínas. Essa matriz age absorvendo a luz UV transmitida no laser para realizar a conversão em energia térmica. A partir dessa ação ocorreu a liberação de íons, e a máquina de MALDI-TOF® realizou automaticamente uma análise dos picos a partir dos tamanhos nos íons positivos e negativos. Este resultado varia conforme a espécie bacteriana e dessa forma caracterizam com grande fidelidade cada espécie analisada. O programa MALDI® finalizou as análises com um relatório prático de porcentagem de similaridade com as cepas registradas no banco de dados do programa.

Foram realizados testes adicionais de motilidade, Indol-positivo e TSA (Tríplice Sugar Iron) para a confirmação das espécies dos isolados que apresentaram divergência nos dois testes utilizados. O MALDI-TOF® apresentou maior compatibilidade e credibilidade, sendo considerado o teste oficial para a identificação de isolados neste trabalho.

3.3 Determinações do perfil de sensibilidade:

O teste de susceptibilidade microbiana dos isolados foi realizado pelo teste de Kirby-Bauer descrito por Bauer et al. (1966). Uma colônia de cada isolado foi submetida a uma diluição em caldo Muller Hinton de 0,5 na escala Mc Farland. Em seguida este material foi distribuído com zaragatoa estéril de maneira uniforme em cada placa contendo Agar Müller Hinton e finalmente os discos dos antimicrobianos escolhidos para este tipo de análise foram dispostos na placa com distância de 3 cm entre si. Por fim as placas prontas foram mantidas em estufa de incubação a 36 °C por no máximo 16 horas. A partir dos valores numéricos obtidos pelo tamanho da circunferência de inibição formada ao redor dos antibióticos testados realizamos as próximas etapas de armazenamento e teste de concentração inibitória mínima (MIC), além da caracterização molecular. Os perfis de sensibilidade/resistência foram identificados através da verificação controle de resistência conforme as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI humano, 2012, 2013; CLSI animal, 2008). Os antibióticos utilizados são provenientes da marca Probac® e a cepa utilizada para controle do teste foi *E. coli* ATCC® 25922 (FDA, Seattle 1946).

Foram realizados 142 antibiogramas dos isolados recuperados na seleção com Ágar MacConkey contendo ácido nalidíxico, ciprofloxacina e ceftriaxona. Deste número foram selecionados100 isolados, selecionados por apresentarem resistência a uma ou mais classe dos antibióticos de interesse deste trabalho, para dar continuidade à pesquisa de genes de resistência aos antibióticos β-lactâmicos e fluoroquinolonas.

Para auxiliar na seleção de bactérias produtoras de ESBL, foi utilizado o meio de seleção ChromAgar® (Probac do Brasil, São Paulo, 2013).

3.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM):

Foi determinada a CIM para ciprofloxacina e enrofloxacina por macrodiluição em Ágar, onde placas de Muller Hinton foram preparadas com diferentes concentrações seriadas de cada antibiótico de interesse, dados de concentração obtidos pelo perfil de resistência de

cada espécie registrado na CLSI humana (2013) e animal (2008). Os isolados foram submetidos ao crescimento em Caldo Muller Hinton por 24 horas. Em seguida foi realizada uma diluição em nível 0,5 de absorbância segundo a escala de Mc Farland® (Cefar, São Paulo, 2011) com ajuda de espectrofotômetro, seguida de outra diluição 1 : 10 em caldo Muller Hinton. Os isolados foram dispostos em carimbos metálicos específicos para este tipo de teste, onde cada poço do carimbo continha 200 µl do isolado após a diluição 1 : 10 citada anteriormente. As placas de Ágar Muller Hinton contendo diferentes concentrações de antibióticos foram então carimbadas com os isolados e incubadas em estufa por 16 horas a 36 °C. A leitura da concentração inibitória mínima foi posteriormente realizada conforme o crescimento das colônias em determinadas concentrações dos antibióticos.

A CIM dos isolados caracterizados pelo antibiograma como resistentes aos β-lactâmicos para os antibióticos Cefotaxima e Ceftazidima foi determinada por Etest® (Biomerieux, Jacarepaguá, 2012), enquanto a CIM para o Ceftiofur foi identificada por macrodiluição seriada em Ágar já descrita. Para os testes com E-test®, os isolados também foram submetidos à diluição de 0,5 na escala McFarland®, distribuídos de maneira uniforme em placa contendo Ágar Muller Hinton, onde as tiras de E-test® foram dispostas no centro. O material também foi incubado a 36 °C por 16 horas. A CIM dos isolados por E-test® foi interpretada a partir do valor obtido no ponto de intersecção entre a elipse de inibição com a borda da fita, segundo a recomendação do fabricante. Os antibióticos testados são da marca Cefar® (São Paulo, 2012) e a cepa utilizada para controle do teste também foi *E. coli* ATCC® 25922.

3.5 Recuperação e Armazenamento dos isolados de interesse

Assim que foram identificados e caracterizados quanto ao fenótipo de resistência aos β-lactâmicos e fluoroquinolonas, os isolados foram armazenados em duplicatas de criotubos com Ágar TSA a 10% para manter a umidade do meio em temperatura ambiente, além do armazenamento em Glicerol a 80% em temperatura de -20 °C.

3.6 Extração de DNA para análises moleculares

Para os testes genotípicos foi realizada inicialmente a extração de DNA por técnica de fervura, estabelecida por Chapman et al. em 2001. Os isolados foram incubados em agitação com temperatura de 36 °C por 18 a 24 horas. Em seguida foram dispostos em microtubos de 2

ml cada e submetidos à centrifugação de 9.000 RPM (rotações por minuto) por 15 minutos em temperatura ambiente. O líquido sobrenadante da centrifugação foi desprezado, e o volume do pellet foi pesado em balança de grande precisão. A partir do valor do peso do pellet (quando superior a 0,050 g), realizou-se a análise proporcional a 10 vezes o valor do peso do pellet para acrescentar o equivalente em H_2O Mili-Q estéril. Assim o produto foi submetido à centrifugação de 9.000 RPM por 15 minutos novamente, com temperatura estável de 4 °C. Após a centrifugação um volume de 100 µL do líquido sobrenadante (contendo o DNA bacteriano) foi recuperado e armazenado em Eppendorf® (Axygen, Union City, 2012) de 700 µL numa temperatura de -20 °C.

3.7 Testes genotípicos para confirmação de genes PMQR e ESBL

Os testes genotípicos foram realizados por análise de PCR. A reação para amplificação dos genes de interesse foi realizada de acordo com o protocolo formulado pelo grupo do laboratório, onde continha 16,25 µL de H_2O; 2,5 µL de dNTP; 2,5 µL de Taq Buffer tampão; 1,5 µL de MgCl; 1 µL de primer molde *Foward* e 1 µL de primer molde *Reverse* (Tabelas 4 e 5), além de 0,25 µL da enzima DNA Taq Polimerase para cada 1 µL de DNA testado. Os produtos utilizados para as reações de PCR são todos da marca Fermentas® (Thermo Fisher Scientific, 2013).

Tabela 4: Sequência de iniciadores para os genes de resistência aos β-lactâmicos ESBL utilizados neste estudo:

Iniciadores	Seqüência nucleotídica (5'- 3')	Pb*	T °C Anelamento	Referência
bla_{TEM} – F bla_{TEM} – R	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CGT G TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA G	861	51°C	BARANIAK et al., 2005
bla_{SHV} – F bla_{SHV} – R	ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG GTT AGC GTT GCC AGT GCT CG	573	53°C	TOLLENTINO et al., 2010
bla_{CTX-M} – F bla_{CTX-M} – R	CGC TTT GCG ATG TGC AG ACC CGC GAT ATC GTT GGT	550	51°C	BONNET et al., 2001
$bla_{CTX-M-2}$ - F $bla_{CTX-M-2}$ - R	ATG ATG ACT CAG AGC ATT CG TGG GTT ACG ATT TTC GCC GC	865	52°C	PARK et al., 2005
$bla_{CTX-M-8}$ - F $bla_{CTX-M-8}$ – R	CTG GAG AAA AGC AGC GGG GG ACC CAC GAT GTG GGT AGC CC	580	61°C	MINARINI et al., 2007
$bla_{CTX-M-15}$ – F $bla_{CTX-M-15}$ – R	CAC ACG TGG AAT TTA GGG ACT GCC GTC TAA GGC GAT AAA CA	995	56°C	MUZAHEED et al., 2008
$bla_{CTX-M-1}$ – F $bla_{CTX-M-1}$ – R	GGT TAA AAA ATC ACT GCG TC TTG GTG ACG ATT TTA GCC GC	542	55°C	SILVA et al., 2009
$bla_{CTX-M-9}$ – F $bla_{CTX-M-9}$ – R	ATG GTG ACA AAG AGA GTG CA CCC TTC GGC GAT GAT TCT	833	55°C	SILVA et al., 2009

Tabela 5: Sequência de primers para os genes PMQR utilizados neste estudo.

Iniciadores	Sequência nucleotídica	Pb*	T °C Anelamento	Referência
QnrA mult-F QnrA mult-R	ATTTCTCACGCCAGGATTTG TGCCAGGCACAGATCTTGAC	570	55.5 °C	JACOBY et al., 2009
QnrB mult-F QnrB mult-R	CGACCTKAGCGGCACTGAAT GAGCAACGAYGCCTGGTAGYTG	510	60°C	JACOBY et al., 2009
QnrD – F QnrD – R	ATGGAAAAGCACTTTATCAATG TTATCGGTGAACAATAACACC	645	48°C	SOUZA et al, 2014
QnrS mult-F QnrS mult-R	ACTGCAAGTTCATTGAACAG GATCTAAACCGTCGAGTTCG	430	53°C	JACOBY et al., 2009
Aac(6')-1b-F Aac(6')-1b-R	TTGCGATGCTCTATGAGTCGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	480	55°C	PARK et al., 2006
QepA-F QepA-R	AACTGCTTGAGCCCGTAGAT GTCTACGCCATGGACCTCAC	595	57°C	KIM, Park et al., 2009
oqxA-F oqxA-R	CTTGCACTTAGTTAAGCGCC GAGGTTTTGATAGTGGAGGTAGG	865	54.5°C	BAO-TAO et al., 2011
oqxB-F oqxB-R	GCGGTGCTGTCGATTTTA TACCGGAACCCATCTCGAT	785	55°C	BAO-TAO et al., 2011

Pb*: Pares de Base
T °C: Temperatura

A confirmação dos genes plasmidiais de resistência às quinolonas e fluoroquinolonas foi direcionada para identificar a presença dos genes *qnrA,qnrB, qnrD, qnrS, qepA, aac(6')-1b, qepA, oqxA* e *oqxB*, assim como a confirmação dos genótipos ESBL foi direcionada para identificar a presença dos genes bla_{TEM}, bla_{SHV} *e* bla_{CTX} com algumas variantes.

As reações de PCR foram amplificadas em termociclador *Mastercycler Gradient* da marca Eppendorf® com os seguintes passos: desnaturação inicial a 95.0 °C por 5 minutos com repetição de 30 ciclos, desnaturação a 95.0 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento conforme iniciadores de cada gene testado (Tabelas 4 e 5) por 1 minuto, temperatura e tempo de extensão a 72 °C por 1 minuto e temperatura e tempo de extensão final a 72 °C por 1 minuto.

Como controles positivos para os genes de interesse foram utilizadas cepas adquiridas na Faculdade de Saúde Pública e na UNIFESP, assim como cepas previamente caracterizadas por sequenciamento pelo nosso grupo de pesquisa (FONTES et al., 2011).

3.8 Determinação dos grupos filogenéticos

A determinação dos grupos filogenéticos dos isolados de *E. coli* resistentes aos β-lactâmicos selecionados foi realizada pelo teste de Clermont através da amplificação dos

genes, conforme metodologia recentemente descrita por Clermont et al. (2013).Cada um dos marcadores foi testado individualmente, em reações contendo 5 µL de DNA molde, 1,5 mM de MgCl2; 0,2 mM de mix de dNTP; 0,4 µM de cada iniciador (Tabela7); 1,5 µM de Taq DNA polimerase, todos da marca Fermentas® em 10X PCR Buffer e água Milli-Q. A temperatura de anelamento dos genes foi 59°C, exceto para os genes de identificação do Grupo E, que conforme protocolo de Clermont e colaboradores (2013) foi determinada 57°C. Após o ciclo de amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%), coradas com GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium, Hayward, 2013), e visualizado em UV (312nm) com auxílio de um transiluminador ultravioleta, foto documentado pelo sistema *L-Pix* (Loccus Biotecnologia, Cotia, 2012).

Tabela 6: Esquema de classificação de filogenia de virulência para *Escherichia coli* (fonte: CLERMONT et al., 2013).

Genótipo Quadruplex					
***arpA* (400bp)**	***chuA* (288bp)**	***yijA* (211bp)**	**TspE.C2 (152bp)**	**Grupo Filogenético**	**Próximo passo**
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	Pode ser confirmado pelo teste do gene *ibeA*
+	-	+	-	A ou C	Realizar o teste do gene C, se C+ = A
+	+	-	-	D ou E	Realizar o teste do gene E, se E+ = D
+	+	-	+	D ou E	Realizar o teste do gene E, se E+ = D
+	+	+	-	E ou chave I	Realizar o teste do gene E, se E - = chave I. Confirmar com primers específicos para chave I
-	-	+	-	Chave I ou II	Confirmar com primers específicos para chaves
-	(476)°	-	-	Chave III, IV e V	Confirmar com primers específicos para chaves
-	-	-	+	Desconhecido	Realizar MLST
-	-	+	+	Desconhecido	Realizar MLST
+	-	+	+	Desconhecido	Realizar MLST
+	+	+	+	Desconhecido	Realizar MLST
-	-	-	-	Desconhecido	Confirmar identificação do Gênero utilizando uidA ou gadA/B, se positivo confirmar usando os primers de chaves e/ou realizar o MLST

A análise dos grupos filogenéticos foi realizada através do esquema de identificação (Tabela 6) elaborado por Clermont et al., 2013.

Tabela 7: Lista de iniciadores para os genes determinantes dos grupos filogenéticos segundo CLERMONT et al., 2013 e ERIC-PCR:

Grupo-Gene	Primer	Sequências dos primers	Pb*	Referências
Quadruplex *chuA*	chuA.1b chuA.2	5′-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3′ 5′-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3′	288	CLERMONT et al., 2000
yjaA	yjaA.1b yjaA.2b	5′-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-3′ 5′-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3′	211	CLERMONT et al., 2013
TspE4.C2	TspE4C2.1b TspE4C2.2b	5′-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3′ 5′-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC-3′	152	CLERMONT et al., 2013
arpA	AceK.f ArpA1.r	5′-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3′ 5′-TCTCCCCATACCGTACGCTA-3′	400	CLERMONT et al., 2004
Grupo E *arpA*	ArpAgpE.f ArpAgpE.r	5′-GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC-3′ 5′-GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG-3′	301	LESCAT et al., 2012
Grupo C *trpA*	trpAgpC.1 trpAgpC.2	5′-TCTGCGCCGGTCACGCCC-3′ 5′-TCTGCGCCGGTCACGCCC-3′	219	LESCAT et al., 2012
ERIC-2		AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	-	BARBATO, 2012

Pb*: Pares de Base
T °C: Temperatura

3.9 Técnica de ERIC-PCR

A comparação dos perfis genotípicos das amostras foi feita pela técnica de ERIC-PCR, onde foi realizada a PCR a partir do marcador específico (Tabela 7) para identificar os genes *housekeeping* dos isolados de *E. coli* e *Enterobacter cloacae* positivos para o gene *bla*(com temperatura de anelamento 52°C). As amplificações dos genes foram submetidas à eletroforese em gel de Agarose (Uniscience, São Paulo, 2012) a 1,5%, corado com GelRed® e observado sob a luz ultra violeta. Em seguida o resultado das amplificações dos genes *housekeeping* foram lançados no programa de alinhamento e análise clonal de cepas Bionumerics®. Os isolados foram analisados e agrupados quanto à relação clonal de cada um.

3.10 Técnica de Multilocus Sequence Typing – MLST

Para o isolado de *E. coli* ESBL positivo com sorotipagem O:25 foi realizada a tipagem por *Multilocus Sequence Typing* – MLST (BRISSE et al., 2004).

O MLST baseia-se no estudo da variação da sequência de nucleotídeos dos fragmentos internos de múltiplos genes metabólicos (genes "*housekeeping*") dentro de uma mesma

espécie bacteriana. Estes genes são altamente conservados e esta técnica permite descobrir múltiplos alelos variantes que caracterizam e classificam membros dentro de uma espécie bacteriana (COOPER; FEIL, 2004). Para a análise de MLST o DNA do isolado de *E. coli* portador do gene $bla_{CTX\text{-}M15}$ com sorotipagem O:25 foi amplificado com os marcadores dos genes *housekeeping adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA* e *recA* (Tabela 8) e as temperaturas padronizadas conforme o protocolo do site (www.pasteur.fr/ mlst).

Tabela 8: Lista de primers para o MLST (INSTITUTO PASTEUR, 2014):

Iniciadores	Sequência nucleotídica (5' – 3')	Pb*	T °C
adK – F adK – R	ATT CTG CTT GGC GCT CCG GG CCG TCA ACT TTC GCG TAT TT	583	54 °C
gyrB – F gyrB – R	TCG GCG ACA CGG ATG ACG GC ATC AGG CCT TCA CGC GCA TC	911	60 °C
fumC – F fumC – R	TCA CAG GTC GCC AGC GCT TC GTA CGC AGC GAA AAA GAT TC	806	54 °C
icd – F icd – R	ATG GAA AGT AAA GTA GTT GTT CCG GC GGA CGC AGC AGG ATC TGT T	878	54 °C
recA – F reca – R	CGC ATT CGC TTT ACC CTG ACC TCG TCG AAA TCT ACG GAC CGG A	780	58 °C
purA – F purA – R	CGC GCT GAT GAA AGA GAT GA CAT ACG GTA AGC CAC GCA GA	816	54 °C
mdh – F mdh – R	AGC GCG TTC TGT TCA AAT GC CAG GTT CAG AAC TCT CTC TGT	932	60 °C
O:25 – F O:25 – R	TCC AGCAGG TGC TGG ATC GT GCG AAA TTT TTC GCC GTA CTG T	347	65 °C

Pb*: Pares de Base
T °C: Temperatura

Após a amplificação dos genes, os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação GFX™ (fabricante GE *Healthcare®*, São Paulo, 2014) seguindo as recomendações do fabricante.

Para o sequenciamento foram utilizados primers para o MLST diluídos a 5mM, conforme recomendação do departamento de Genoma USP (fonte: site do Centro de Pesquisas do Genoma Humano - USP), onde os DNAs preparados foram submetidos para o sequenciamento de nucleotídeos.

4 RESULTADOS

Durante o ano de 2012, foram realizadas 216 coletas em 108 animais de estimação (29 gatos e 79 cães) no Centro de Zoonoses da Cidade de São Paulo e em um Centro de Acolhimento de Animais no Bairro do Rio Pequeno (Figuras 6, 7, 8 e 9), além de vários animais situados em três residências particulares. Os animais foram coletados na região anal e bucal, a nenhum apresentava algum tipo de infecção, além de não estarem em tratamento antimicrobiano. As coletas foram previamente autorizadas e consentidas pelos donos e responsáveis pelos animais (conforme apêndices), e seguiram procedimentos de ética, aprovados pelo Departamento de Microbiologia do ICB-USP.

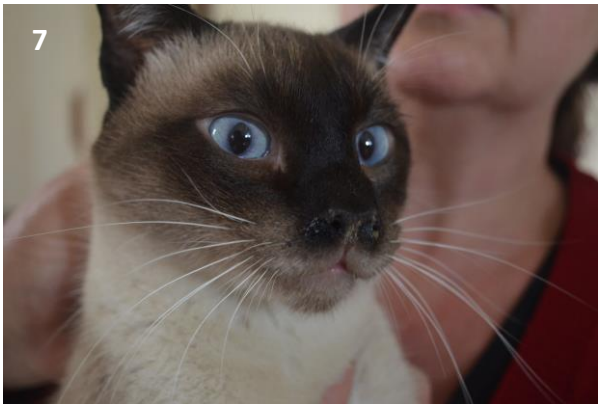


Figura 6, Figura 7, Figura 8, Figura 9: Gatos abrigados em um centro de acolhimento de animais situado no bairro Rio Pequeno, onde foram realizadas algumas das coletas e cães abrigados no Centro de Controle de Zoonoses da Cidade de São Paulo.

As zaragatoas estéreis usadas na coleta em meio AMI® foram passadas em placas de Ágar MacConkey contendo ácido nalidíxico (16 µg/mL) e ceftriaxona (2 µg/mL), dois antibióticos suplementados para a seleção de bactérias resistentes aos antibióticos das classes

das quinolonas e cefalosporinas, respectivamente. Após a incubação em estufa por 24 h, as espécies bacterianas selecionadas que cresceram no meio seletivo foram isoladas por estriamento e posteriormente identificadas.

A identificação de algumas espécies realizada com o conjunto de identificação Bactray® (para uma maior análise das técnicas existentes) não foi satisfatória devido à grande diversidade de microrganismos das microbiotas analisadas, com espécies não comumente identificadas em casos de infecções humanas, o que de fato, poderia ser um fator limitante de métodos comerciais que tem sido desenvolto principalmente para a rotina laboratorial em medicina humana. Desta forma realizamos uma segunda análise por MALDI-TOF® para confirmar a identificação. Embora a comparação de ambos os métodos não foi um dos objetivos principais do trabalho, obtivemos uma divergência de 48% em relação às duas técnicas usadas, como consta na tabela 9. Como suporte a algumas limitações do sistema Bactray®, algumas análises bioquímicas foram realizadas adicionalmente, como o teste de Indol para diferenciação entre *Shigella sonnei* e *Escherichia coli* e o teste de oxidase e incubação a 42°C para identificar isolados de *Pseudomonas* spp.

Tabela 9: Comparação de identificações obtidas pelo teste Bactray® e pelo teste de espectrofotometria de massas MALDI-TOF®:

Isolado	***Identificação por Bactray®***	***Identificação por Maldi-tof®***
G20B	*Burkholderia pseudomallei*	*Pseudomonas aeruginosa*
G29	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
G21	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
G9A	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
G17	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
G46C	*Escherichia coli*	*Acinetobacter johnsonii*
G46F	*Pseudomonas aeruginosa*	*Pseudomonas spp.*
G1B1	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*	*Escherichia coli*
G28A	*Escherichia coli*	*Acinetobacter guillouiae*
G18	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*	não identificado
C35C	*Burkholderia pseudomallei*	*Klebsiella pneumoniae*
76AC	*Klebsiella ozaenae*	*Enterobacter cloacae*

Tabela 9: Continuação: Comparação de identificações obtidas pelo teste Bactray® e pelo teste de espectrofotometria de massas MALDI-TOF®:

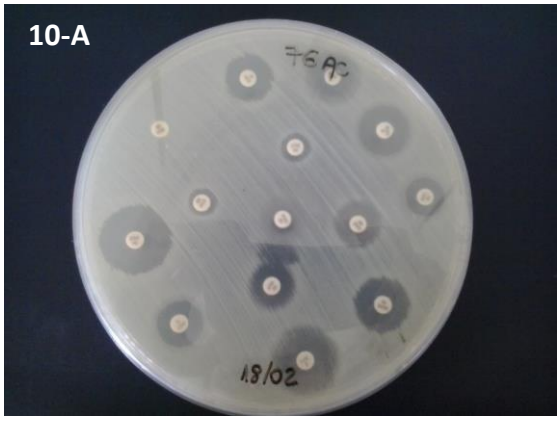
Isolado	*Identificação por Bactray®*	*Identificação por Maldi-tof®*
C10A	*Providencia alcalifaciens*	*Providencia alcalifaciens*
56AC2	*não identificado*	*Escherichia coli*
59AC2	*Escherichia fergusonii*	*Escherichia coli*
66BN1	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
65AC1	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
67BC	*Aeromonas hyfrophila*	*Escherichia coli*
67BN1	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
64AC	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
64AN1	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
60BN	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
66AN1	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
69BC1	*Pseudomonas putida*	*Escherichia coli*
39AN	*Pseudomonas aeruginosa*	*Pseudomonas aeruginosa*
68AC	*Aeromonas hyfrophila*	*Aeromonas hyfrophila*
40BN	*Salmonella spp.*	*Escherichia coli*
41AC1	*Salmonella spp.*	*Enterobacter cloacae*
41AN21	*Yokenella regensburgei*	*Enterobacter cloacae*
42AC	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
C17A	*Yokenella regensburgei*	*Yokenella regensburgei*
C69	*Chromobacterium violaceum*	*Bordetella bronchiseptica*
C51B	*Pseudomonas aeruginosa*	*Pseudomonas aeruginosa*
56AN1	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
49BN	*Burkholderia pseudomallei*	*Pseudomonas aeruginosa*
49BC1	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*

Das 216 amostras coletadas e analisadas, 142 isolados foram analisados quanto ao perfil de resistência aos antibióticos listados na tabela 10 pela técnica de disco difusão, e deste total foram recuperados 100isoladosbacterianos Gram-negativos com perfil fenotípico de

resistência às quinolonas / fluoroquinolonas e cefalosporinas de amplo espectro (Figura 10A),os quais foram analisados quanto à concentração inibitória mínima (CIM)e os genótipos responsáveis pelo mecanismo de resistência de interesse neste trabalho. Do total de 100 bactérias isoladas, 21 são provenientes de amostras de gatos (sendo 16 originadas de fezes e 5 originadas de saliva), enquanto 79 isolados são provenientes das amostras coletadas em cães (sendo 54 originadas de fezes e 25 originadas de saliva).

Os antibiogramas dos isolados de interesse realizados por disco-difusão apresentaram uma resistência bastante considerável aos antibióticos testados (Figura 10A). O ácido nalidíxico e o sulfametoxazol / trimetoprim foram os antibióticos que apresentaram maior percentual de resistência dentre os antibióticos testados. Os isolados pertencentes à espécie *Enterobacter cloacae* foram o grupo de bactérias que apresentou maior resistência aos antibióticos testados. Nas tabelas 12A e 12B encontram-se os percentuais de resistência em relação às espécies encontradas nas amostras coletadas.

Os 17 isolados que apresentaram uma zona fantasma na inibição de crescimento entre cefotaxima e amoxilina + ácido clavulânico foram submetidos ao teste de produção de β-lactamases por ChromAgar® ESBL (Figura 10B) antes mesmo da identificação das espécies para verificar quanto à praticidade do uso deste teste. Como resultado, todos os isolados que apresentaram zona fantasma no teste de disco-difusão obtiveram resultado positivo no teste de ChromAgar® ESBL (com colônias de coloração azulada para espécies *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp. e a cor roxa para *E. coli*, todas produtoras de ESBL), o que confirma a eficácia do teste, bem como a validade do produto para fins de consolidação e praticidade em procedimentos científicos.



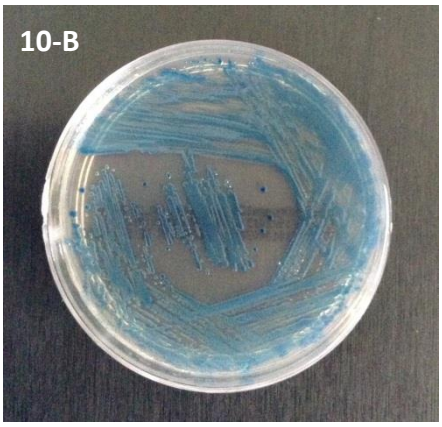


Figura 10A e B: Confirmação do fenótipo ESBL por dupla difusão do disco (A) e ChroMagar® ESBL (B), onde observa-se em coloração azul, *Enterobacter cloacae* com fenótipo positivo para produção de β-lactamases.

Das amostras coletadas de fezes e saliva de animais de companhia selecionados por Ágar MacConkey com ácido nalidíxico / ciprofloxacina ou ceftriaxona e posterior análise por disco-difusão, foram recuperados 85 isolados com fenótipo de resistência para os antibióticos da classe das fluoroquinolonas, sugestivo para expressão de genes PMQR, enquanto um total de 62 isolados apresentou fenótipo de resistência aos β-lactâmicos, sugestivo para expressão de genes ESBL. Dentre o total de isolados resistentes aos beta-lactâmicos, 27% dos isolados expressaram a zona fantasma confirmatória para produção de β-lactamases no antibiograma por disco-difusão.

Os ensaios confirmatórios qualitativos e quantitativos, realizados para a determinação da concentração mínima inibitória (CIM) das fluoroquinolonas obtiveram resultados satisfatórios. Um total de 85 isolados foram submetidos ao teste de concentração mínima inibitória por diluição seriada em Ágar para enrofloxacina (veterinário) e ciprofloxacina (humano), e deste resultado 90,5% apresentaram nível de inibição intermediária e resistente para enrofloxacina, enquanto 58,8% apresentaram nível de inibição intermediária e resistente para ciprofloxacina. Um total de 24 isolados apresentou resistência cruzada concomitante aos dois antibióticos. Apenas oito isolados (5 *E. coli*, 1 *Yokonella regesburgei*, 1 *Pseudomonas aeruginosa* e 1 *Bortedella bronchiseptica*) tinham sensibilidade à ciprofloxacina e à enrofloxacina, concomitantemente. Apresentar resistência alta ou intermediária a pelo menos um dos antibióticos em questão foi o critério inicial para a seleção de isolados que foram submetidos aos testes genotípicos.

Dos isolados selecionados para os testes genotípicos para PMQR, foi constatado que a maioria (78%) pertence à espécie *Escherichia coli*, e um total de 7% pertence à família Pseudomonadaceae.

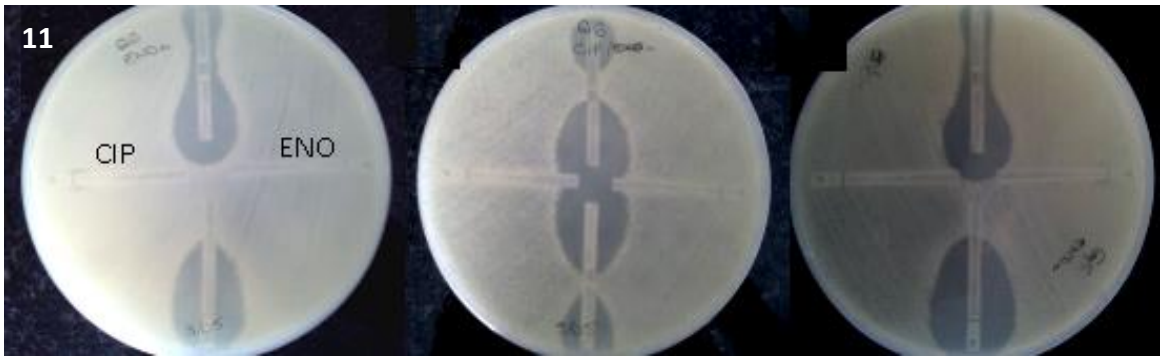


Figura 11: Resultados de três isolados avaliados por E-test® para determinação da CIM. Cefotaxima (CTL), ciprofloxacina (CIP, CIM > 32 µg/mL) e enrofloxacina (ENO, CIM > 32 µg/mL). Destaque para o isolado G6-A, apresentando total resistência a ciprofloxacina (CIP) e enrofloxacina (ENO).

Os 17 isolados com perfil fenotípico positivo para produção de enzimas ESBL com presença de zona fantasma e confirmação por ChromAgar® ESBL e os 45 isolados que

apresentaram resistência a dois ou mais antibióticos β-lactâmicos mas não apresentaram fenótipo de inibição por zona fantasma entre o disco de amoxilina + ácido clavulânico foram submetidos ao teste de concentração inibitória mínima por diluição em Ágar para ceftiofur (animal) e E-test® para cefotaxima e ceftazidima (humano) (Figura 11).

Em relação aos testes de concentração inibitória mínima, do grupo de isolados com fenótipo positivo a partir da expressão de zona fantasma para a produção de ESBL, todos os isolados apresentaram resistência entre 16 µg/ml e acima de 64 µg/ml, tanto para cefotaxima quanto para ceftiofur. O grupo de β-lactâmicos resistentes sem fenótipo confirmatório por zona fantasma apresentou um percentual de 67% (N = 30) de resistência para cefotaxima / ceftazidima, enquanto 87% (N = 39) apresentou resistência ao ceftiofur. É importante destacar que 53% (N = 24) dos isolados resistentes aos dois antibióticos β-lactâmicos testados no CIM são cepas de *E. coli*.

Conforme as análises moleculares para os genes ESBL, dentre os isolados que apresentaram perfil fenotípico confirmatório no teste de disco-difusão, 14 foram identificados carregando o gene $bla_{\text{CTX-M}}$ like, 9 isolados positivos para o gene bla_{TEM}-*like* e 6 isolados positivos para bla_{SHV}-*like* (13 *E. coli*, 3 *Enterobacter cloacae* e 1 *Pseudomonas aeruginosa*) (Tabela 13).

O grupo de isolados que não apresentaram fenótipo confirmatório a partir de zona fantasma no teste de disco-difusão, porém apresentaram resistência a dois ou mais antibióticos da classe dos β-lactâmicos foram submetidos a um *screening* molecular para verificar a presença dos genes produtores de β-lactamases estudados neste trabalho, além do gene CMY-2, responsável pela produção de AmpC para uma verificação adicional de genes de resistência. Neste *screening* pôde-se verificar em 24 cepas a presença do gene $bla_{\text{CTX-M}}$ e bla_{SHV} em 9 cepas, enquanto o gene bla_{TEM} foi encontrado em 17 cepas. Com o teste molecular adicional para o gene bla_{CMY} nos isolados que não apresentaram nenhum destes genes citados anteriormente, pôde-se observar um total de 12 cepas AmpC positivas.

Nos isolados de interesse, que apresentaram fenótipo confirmatório ESBL com zona fantasma entre os antibióticos cefotaxima e amoxilina + ácido clavulânico, cinco variantes do gene $\text{bla}_{\text{CTX-M}}$ foram testadas. Dez isolados apresentaram o gene $bla_{\text{CTX-M-1}}$, 6 para o gene $bla_{\text{CTX-M-2}}$, 1 para o gene $bla_{\text{CTX-M-8}}$, para o gene $bla_{\text{CTX-M-9}}$ e por fim 4 para o gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (sendo 3 destes membros da espécie *Enterobacter cloacae* e 1 da espécie *E. coli*).

Os 13 isolados de *E. coli* com fenótipo e genótipo confirmatórios para o gene $bla_{\text{CTX-M}}$ like foram submetidos ao teste de grupos filogenéticos de virulência de Clermont. Conforme dados na tabela 13, quatro isolados foram identificados como pertencentes ao grupo A, três

pertencentes ao grupo D, dois ao grupo C e apenas um ao grupo B1. Nenhum dos isolados foi caracterizado no grupo B2, considerado grupo endêmico virulência de maior disseminação no mundo.

Em relação aos genes de resistência às quinolonas / fluoroquinolonas, foram selecionados 77 isolados para os testes moleculares de detecção dos genes plasmidiais de resistência. Considerando que houve um número maior de isolados resistentes à enrofloxacina do que à ciprofloxacina, o critério para a seleção destes isolados foi o resultado de resistência alta ou intermediária para o primeiro antimicrobiano citado. Deste total, 21% (N = 16) de cepas foram positivas para o gene *qnrA* (14 *E. coli*, 1 *Proteus mirabilis* e 1*Aeromonas hyfrophila*), 31% (N = 24) das cepas foram positivas para o gene *qnrB*(19 *E. coli*, 3 *Enterobacter cloacae*, 1 *Klebsiella pneumoniae* e 1 *Aeromonas hyfrophila*), 18% (N = 14) foram positivas para o gene *qnrS* (11 *E. coli*, 1 *Raoutella ornithinolytica*, 1 *Enterobacter cloacae* e 1 *Aeromonas hyfrophila*), 3% (N = 2) de cepas de *Enterobacter cloacae* positivas para o gene *aac(6')-Ib-cr*. Em relação aos genes de produção de bombas de efluxo foram totalizados 4% (N = 3) de cepas confirmatórias para o gene *qepA* (1 *Raoutella ornithinolytica*, 1 *E. coli*, 1 *Enterobacter cloacae)*, 14% (N = 11) confirmatórias para o gene *oqxA* (4 *E. coli*, 3 *Enterobacter cloacae*, 2 *Raoutella ornithinolytica*, 1 *Klebsiella pneumoniae* e 1 *Aeromonas hyfrophila*), além da confirmação do gene *oqxB* em 4% (N = 3) das cepas (2 *E. coli* e 1 *Raoutella ornithinolytica*) apresentadas no quadro 1. Nenhuma das cepas foram positivas para o gene *qnrD*.

Numa avaliação final da etapa de caracterização molecular, 16% (N = 16) das cepas foram identificadas como portadoras de genes codificadores de enzimas β-lactamases e portadoras de genes plasmidiais de resistência à quinolonas e fluoroquinolonas ao mesmo tempo. O quadro 2 apresenta a relação de cepas MDR (multirresistente) de acordo com a espécie e a sensibilidade aos antibióticos testados por macrodiluição em Ágar.

Tabela 10: Percentual de resistência aos antimicrobianos do total de 100 isolados de bactérias gram-negativas testadas e selecionadas pela técnica de difusão de disco (Kirby-Bauer).

Antimicrobiano	**Classe**	**Percentual (%)**
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	β-lactâmico + inibidor	62%
Cefoxitina	Cefamicina	52%
Cefotaxima	Cefalosporina de 3ª geração (humana)	68%
Ceftazidima	Cefalosporina de 3ª geração (humana)	42%
Ceftiofur	Cefalosporina de 3ª geração (veterinária)	60%
Aztreonam	Monobactâmico	56%
Ertapenem	Carbapenêmico	23%
Ciprofloxacina	Fluoroquinolona de 2ª geração	46%
Enrofloxacina	Fluoroquinolona de 2ª geração (veterinária)	68%
Ac. Nalidíxico	Quinolona de 1ª geração	89%
Norfloxacina	Fluoroquinolona de 2ª geração	32%
Levofloxacina	Fluoroquinolona de 3 geração	34%
Pefloxacina	Fluoroquinolona de 2ª geração	72%
Moxifloxacina	Fluoroquinolona de 4ª geração	35%
Sulfametoxazol-Trimetoprim	Sulfonamida	79%
Gentamicina	Aminoglicosídeo	46%
Amicacina	Aminoglicosídeo	33%
Tigeciclina	Glicilciclina	33%

Tabela 11 (A e B). Percentual de resistência (%) aos antimicrobianos das espécies de bactérias Gram-negativas encontradas nas amostras de cães e gatos coletadas em 2012.

Espécies (*11*)	% de Resistência									
	AMC	CTX	CTF	ATM	CAZ	CIP	SUT	ETP	PEF	LVX
Acinetobacter spp. (3)	67	0	33	100	100	33	0	100	67	33
Aeromonas hydrophila (1)	100	100	100	100	0	0	100	100	100	0
Bortedella bronchiseptica (1)	100	100	100	100	100	0	100	0	100	0
E. coli (76)	60	67	60	55	45	51	83	16	71	37
Enterobacter cloacae (3)	100	100	100	100	100	100	100	33	100	33
Klebsiella pneumoniae (1)	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0
Proteus mirabillis (1)	0	0	0	0	0	0	100	0	100	100
Providencia alcalifaciens (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*Pseudomonas spp. (*9)	78	78	68	44	0	22	100	67	78	33
Raoutella ornithinolytica (2)	33,3	0	0	33	0	33	0	0	33	0
Yokonella regesburgei (1)	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0
Não identificado (1)	0	100	100	100	100	0	0	0	100	0

Espécies (11)	% de Resistência								
	NOR	NAL	ENO	MXF	GEN	CFO	OFX	TIG	AMI
Acinetobacter spp. (3)	33	33	33	0	0	2	33	0	0
Aeromonas hydrophila (1)	0	0	100	100	0	100	0	100	0
Bortedella bronchiseptica (1)	0	100	0	0	0	100	0	0	0
E. coli (76)	35	91	72	38	47	43	25	25	31
Enterobacter cloacae (3)	0	100	67	100	100	100	0	0	33
Klebsiella pneumoniae (1)	0	100	100	0	0	0	0	0	0
Proteus mirabillis (1)	100	100	100	0	100	100	0	100	100
Providencia alcalifaciens (1)	0	0	33	0	100	67	0	100	100
*Pseudomonas spp. (*9)	22	100	44	22	22	78	22	78	22
Raoutella ornithinolytica (2)	33	67	67	0	0	33	33	33	33
Yokonella regesburgei (1)	0	100	0	0	100	100	0	100	100
Não identificado (1)	0	100	0	0	0	0	100	0	0

Quadro 1: Isolados recuperados de amostras de fezes e saliva de cães e gatos selecionados por diluição de ciprofloxacina (≥2µg/ml) em Ágar MacConkey,identificados por espécie e caracterizados fenotípica e genotipicamente.

Isolado	Animal	Espécie	Perfil Fenotípico Resistência	MIC (µg/ml) ENO		CIP		Perfil Genotípico
G2	Gato / Fezes	*E. coli*	NOR - NAL - ENO - CIP - PEF – LVX	>64	R	64	R	*qnrS*
G2A1	Gato / Fezes	*Raoutella ornithinolytica*	CIP - ENO – NAL	1	I	0,5	S	*qepA, oqxA*
G5A	Gato / Fezes	*E. coli*	CIP - ENO – NAL	>64	R	64	R	*qnrA, qnrS*
G6A	Gato / Fezes	*E. coli*	CIP - ENO – NAL	>64	R	64	R	*qnrS*
G6B	Gato / Fezes	*E. coli*	CIP - ENO – NAL	>64	R	64	R	*qnrA*
G9A	Gato / Fezes	*E. coli*	NAL	64	R	32	R	*qnrS, oqxA*
G9K	Gato / Fezes	*E. coli*	CIP - PEF - LVX - NAL - ENO - OFX	1	I	0,3	S	*qepA*
G10-2	Gato / Fezes	*E. coli*	CIP - PEF - LVX - NAL – OFX	8	R	0,5	S	*qnrA, qnrS*
G17	Gato / Fezes	*E. coli*	PEF – NAL	16	R	32	R	*qnrS*
G29	Gato / Fezes	*E. coli*	CIP - NAL	64	R	32	R	*qnrA*
G46B	Gato / Fezes	*Raoutella ornithinolytica*	NAL	1	I	0,5	S	*qnrS, oqxA, oqxB*
G46E	Gato / Fezes	*E. coli*	LVX- PEF - NAL – OFX	32	R	16	R	*qnrS*
C6A	Cão / Saliva	*E. coli*	CIP - PEF - NOR - NAL - ENO	0,03	S	8	R	*qnrB, qnrS*
C6B	Cão / Saliva	*E. coli*	PEF - NAL - ENO	1	I	0,5	S	*qnrB*
C10B	Cão / Saliva	*E. coli*	CIP - PEF - LVX - NOR - NAL - ENO - MXF	1	I	64	R	*qnrA*
C13A	Cão / Fezes	*E. coli*	CIP - PEF - NAL - ENO	2	I	0,5	S	*qnrA / qnrB / qnrS*
C14A	Cão / Saliva	*E. coli*	PEF - NAL	1	I	1	S	*qnrA / qnrB / oqxA / oqxB*
C17-A	Cão / Fezes	*Yokonella regesburgei*	NAL	0,12	I	0,1	S	*qnrA / oqxA*
C19A-1	Cão / Fezes	*Proteus mirabilis*	PEF - LVX - NOR - NAL - ENO	32	R	4	R	*qnrA*
C33A1	Cão / Fezes	*E. coli*	PEF - NAL - ENO	7	R	1	S	*qnrA, qnrB, qnrS*

Quadro 1: Continuação: Isolados recuperados de amostras de fezes e saliva de cães e gatos selecionados por diluição de ciprofloxacina (≥2µg/ml) em Ágar MacConkey, identificados por espécie e caracterizados fenotípica e genotipicamente.

Isolado	Animal	Espécie	Perfil Fenotípico Resistência	MIC (µg/ml)				Perfil Genotípico
				ENO		CIP		
C33B-1	Cão / Fezes	*E. coli*	CIP - PEF - NAL – ENO	1	I	0,3	S	*qnrB*
C33C-1	Cão / Fezes	*E. coli*	PEF - NAL - ENO	8	R	0,5	S	*qnrA, qnrB*
C33D-1	Cão / Fezes	*E. coli*	CIP - PEF - NAL - ENO	1	I	0,4	S	*qnrA, qnrB, qnrS*
C35A	Cão / Fezes	*E. coli*	PEF - NAL - ENO	1	I	0,5	S	*qnrB*
C35C	Cão / Fezes	*Klebsiella pneumoniae*	PEF - NAL – ENO	1	I	0,5	S	*qnrB / oqxA*
C35D	Cão / Fezes	*E. coli*	PEF - NAL – ENO	8	R	1	S	*qnrB*
C39-1	Cão / Fezes	*E. coli*	- PEF - NAL – ENO	3	R	0.38	S	*qnrB*
C51-A	Cão / Fezes	*E. coli*	PEF - LVX - NOR - NAL - ENO – MFX	>64	R	32	R	*qnrA*
C52-4	Cão / Saliva	*E. coli*	CIP - PEF - LVX - NOR - NAL - ENO – MXF	>64	R	8	R	*qnrA*
C68A-2	Cão / Saliva	*E. coli*	CIP - PEF - LVX - NOR - NAL - ENO – MFX	16	R	8	R	*oqxA*
C68-B	Cão / Saliva	*E. coli*	PEF - LVX - NAL – ENO	1	I	0,5	S	*qnrS*
39AC2	Cão / Fezes	*E. coli*	CIP - PEF - NAL - ENO - MFX	2	I	0,5	S	*qnrA / qnrB*
41AC1	Cão / Fezes	*Enterobacter cloacae*	CIP - PEF - LVX - NAL - ENO – MFX	>64	R	32	R	*qnrB / qnrS / qepA / aac(6')-Ib-cr / oqxA*
41AC2	Cão / Fezes	*E. coli*	CIP - NAL - ENO – MFX	2	I	0,5	S	*qnrA / qnrB*
41AN21	Cão / Fezes	*Enterobacter cloacae*	CIP - PEF - NAL - ENO - MFX	2	I	1.5	S	*qnrB / aac(6')-Ib-cr / oqxA*
56AC2	Cão / Fezes	*E. coli*	PEF - NAL - ENO - MFX	1	I	0,3	S	*qnrB*
59AC1	Cão / Fezes	*E. coli*	NAL - ENO	2	I	0,1	S	*qnrB*
65AC1	Cão / Fezes	*E. coli*	PEF - NAL - ENO – GEN	2	I	0,5	S	*qnrB*
76AC	Cão / Fezes	*Enterobacter cloacae*	CIP - PEF - NAL - ENO – MFX	2	I	1.0	S	*qnrB / oqxA*

Linha escura: Isolados apresentando resistência aos antibióticos ciprofloxacina e enrofloxacina através da concentração inibitória mínima (MIC), com fenótipo confirmatório para os genes de resistência plasmidial às Q/FQ.

Tabela 12: Características microbiológicas e epidemiológicas, caracterização fenotípica e genotípica de ESBLem alguns isolados estudados, coletados no ano de 2012.

Isolado	*Origem*	*Espécie*	*Fenótipo*	*MIC (µg/mL) CT/CTL*	*MIC (µg/mL) CTF*	*MIC (µg/mL) ENO*	*MIC (µg/mL) CIP*	*E-test® SUT*	*E-test® GEN*	*Chr®ESBL*	*Genótipo ESBL*	*Genótipo PMQR*	*Grupo filogenético de Virulência*
C8	Cão / Oral	*E. coli*	AMC - CTX - CTF - ATM - CAZ - CIP - SUT - PEF - NAL - ENO - GEN - CFO - TIG – AMI	**>16/0.032**	**>64**	**>64**	**>64**	**>64**	**>64**	+	CTXM-15 / CTXM-2 / CTXM-1 / SHV / TEM	*N/E*	C
C10B	Cão / Oral	*E. coli*	ATM - CTF - AMC - CTX - CIP - PEF - LVX - NOR - NAL - ENO - MXF - GEN - TIG – AMI	**>16/0.032**	**>64**	**>64**	**16**	**>64**	**>64**	+	TEM	*qnrA*	C
C33A-1	Cão / Fecal	*E. coli*	CTX - CTF - ATM - SUT - PEF - NAL - ENO – AMI	**>64**	**>64**	**8**	**1**	**>64**	**0,25**	+	CTXM-1 / CTXM-2	*qnrA, qnrB, qnrS*	D
C33A-2	Cão / Fecal	*E. coli*	CTX - CTF - ATM - SUT - PEF - NAL - ENO - GEN - OFX	**>64**	**>64**	**0**	**0,5**	**>64**	**16**	+	CTXM-2	*N/A*	F
C33D-1	Cão / Fecal	*E. coli*	AMC - CTX - CTF - ATM - CAZ - CIP - SUT - PEF - NAL - ENO - TIG - AMI	**>64**	**>64**	**1**	**0,38**	**>64**	**0,5**	+	CTXM-1	*qnrA, qnrB, qnrS*	D
C19-C	Cão / Fecal	*E. coli*	AMC - CTX - CTF - ATM - SUT - PEF - NAL - ENO - GEN	**>64**	**>64**	**2**	**2**	**>64**	**8**	+	CTXM-2	*N/A*	F
G2	Gato / Fecal	*E. coli*	CTF - NOR - NAL - ENO - CIP - SUT - PEF – LVX	**32**	**64**	**>64**	**64**	**>64**	**1**	+	CTXM-2 / CTXM-1 / TEM / SHV	*qnrS*	B1
C33B-1	Cão / Fecal	*E. coli*	CTX - CTF - ATM - CIP - SUT - PEF - NAL - ENO - TIG	**>16 / 0.125**	**>64**	**1**	**0,25**	**>64**	**2**	+	CTXM-1 / CTXM-2 / SHV	*qnrB*	D
C39-1	Cão / Fecal	*E. coli*	AMC - CTX - CTF - CAZ - SUT - PEF - NAL - ENO - CFO	**>64**	**>64**	**3**	**0.38**	**>64**	**2**	+	TEM	*qnrB*	D

Chr®: ChromAgar® ESBL
N/E = Não especificado
N/A = Não avaliado

Tabela 12: Continuação: Características microbiológicas e epidemiológicas, caracterização fenotípica e genotípica de ESBLem alguns isolados estudados, coletados no ano de 2012.

Isolado	*Origem*	*Espécie*	*Fenótipo*	*MIC (µg/mL) CT/CTL*	*MIC (µg/mL) CTF*	*MIC (µg/mL) ENO*	*MIC (µg/mL) CIP*	*E-test SUT*	*E-test GEN*	*Chr® ESBL*	*Genótipo ESBL*	*Genótipo PMQR*	*Grupo filogenético de Virulência*
C68A-2	Cão / Fecal	*E. coli*	AMC - CTX - CTF - ATM - CIP - SUT - PEF - LVX - NOR - NAL - ENO – MFX	**>16 / CTL 0.94**	**>64**	**16**	**8**	**>64**	**4**	+	CTXM-1 / CTXM-9 / TEM / SHV	*oqxA*	A
51AN2	Cão / Fecal	*E. coli*	AMC - CTX - CTF - ATM - CIP - SUT - PEF - LVX - NOR - NAL - ENO - MXF – OFX	**>16 / CTL 0.47**	**>64**	**16**	**8**	**>64**	**2**	+	CTXM-15 / TEM	*N/E*	A
51AC11	Cão / Fecal	*E. coli*	AMC - CTX - CTF - ATM - CAZ - CIP - PEF - LVX - NOR - NAL - ENO - MFX - GEN - OFX – AMI	**>16 / CTL 0.47**	**>64**	**16**	**8**	**>64**	**2**	+	CTXM-9 / TEM	*N/E*	A
56AC1	Cão / Fecal	*E. coli*	AMC - CTX - CTF - ATM - CIP - SUT - PEF - LVX - NOR - NAL - ENO – MFX	**>16 / CTL 0.47**	**64**	**0,5**	**0,12**	**>64**	**1**	+	CTXM-8 / CTXM-1 / TEM / SHV	*N/A*	A
76AC	Cão / Fecal	*E.cloacae*	AMC - CTX - CTF - ATM - CAZCIP - SUT - PEF - NAL - ENO - MFX - GEN – CFO	**>64**	**>64**	**2**	**1.0**	**>64**	**24**	+	CTXM-15 / CTXM-1	*qnrB/oqxA*	-
41AC1	Cão / Fecal	*E. cloacae*	AMC - CTX - CTF - ATM - CAZ - CIP - SUT - ETP - PEF - LVX - NAL - ENO - MFX - GEN – CFO	**>64**	**>64**	**>64**	**32**	**>64**	**48**	+	CTXM- 1 / CTXM-15 / TEM / SHV	*qnrB / qnrS / qepA / aac6(1')b / oqxA*	-
41AN21	Cão / Fecal	*E. cloacae*	AMC - CTX - CTF - ATM - CAZ - CIP - SUT - PEF - NAL - ANO - MFX - GEN - CFO – AMI	**>64**	**>64**	**2**	**1.5**	**32**	**32**	+	CTXM-15 / CTXM-1	*qnrB / aac6(1')b / oqxA*	-
C51B	Cão / Oral	*P. aeruginosa*	AMC - CTX - CTF - ATM - SUT - ETP - PEF - LVX - NAL - ENO - CFO – TIG	**4**	**>64**	**0.12**	**0.50**	**R**	**0.75**	+	N/E	*qnrA*	-

Chr®: **ChromAgar® ESBL**
N/E = Não especificado
N/A = Não avaliado

Tabela 13: Cepas com fenótipo negativo para produção de β-lactamases no teste de disco-difusão, mas que apresentaram perfil de resistência na concentração inibitória mínima, e posteriormente foram caracterizadas como portadoras dos genes de produção de β-lactamases:

Cepa	Espécie	MIC (µg/ml)/ E-test® CTX / CAZ		MIC(µg/ml) CTF		Genótipo ESBL
G46C	*A. johnsonii*	CTX >64	R	2	S	CTX-M
G10-2	*E. coli*	CTX 16	R	1	S	TEM
G28-A	*A. guillouiae*	CTX 6	R	>64	R	TEM
G46E	*E. coli*	CTX >64	R	32	R	CTX-M / TEM
C6B	*E. coli*	CTX 32	R	32	R	CTX-M / TEM
C10B	*E. coli*	CTX 32	R	64	R	CTX-M / TEM
C14A	*E. coli*	TZ 50 / TZL .064	S	> 64	R	TEM
C16-2	*E. coli*	CTX 04	R	> 64	R	SHV / TEM
C16-4	*E. coli*	CAZ 16	R	> 64	R	TEM
C33C1	*E. coli*	CTX 32	R	> 64	R	CTX-M
C33B2	*E. coli*	CTX 64	R	> 64	R	CTX-M
C37D	*E. coli*	TZ 1.0 / TZL 0.19	S	> 64	R	CTX-M / TEM
C54C	*E. coli*	CAZ 2	S	>64	R	CTX-M / TEM
59AC1	*E. coli*	CTX 4	R	>64	R	SHV / TEM
60AC2	*E. coli*	CTX 32	R	>64	R	SHV
73AC22	*E. coli*	CTX 8	R	16	R	SHV
51AC2	*E. coli*	CTX 32	R	16	R	TEM / SHV
54AN1A	*E. coli*	CAZ S	S	4	I	TEM
64AC	*E. coli*	CAZ R	R	16	R	TEM
42AC	*E. coli*	CTX 16	R	32	R	SHV / TEM
41AC2	*E. coli*	CTX >64	R	8	R	SHV
C35A	*E. coli*	CTX 32	R	8	R	SHV
40BN	*E. coli*	CAZ S	S	0,25	S	SHV
G1B1	*E. coli*	CTX 1	S	16	S	TEM

Quadro 2: Identificação, origem, valores de concentração inibitória mínima (MIC) a duas classes de antimicrobianos, Cefalosporinas e Fluoroquinolonas, bem como a e caracterização genotípica de cepas multirresistentes (MR) provenientes de cães e gatos abrigados em dois centros de acolhimento de animais abandonados na cidade de São Paulo.

Cepa	Espécie	Animal	Origem	MIC CTX / CAZ	MIC CTF	MIC ENO	MIC CIP	Genótipo ESBL	Genótipo PMQR
G2	*E. coli*	Gato	Fezes	32	64	>64	64	CTXM-2 / CTXM-1 / TEM / SHV	*qnrS*
G46E	*E. coli*	Gato	Fezes	CTX >64	32	32	16	CTX-M LIKE / TEM	*qnrS*
C6B	*E. coli*	Cão	Saliva	CTX >64	>64	1	0,5	CTX-M LIKE / TEM	*qnrB*
C10B	*E. coli*	Cão	Saliva	CTX 32	64	1	64	TEM	*qnrA*
C14A	*E. coli*	Cão	Saliva	CAZ S	>64	2	0,5	TEM	*qnrA /qnrB / oqxA / oqxB*
C33A1	*E. coli*	Cão	Fezes	CTX >64	>64	8	1	CTXM-1 / CTXM-2	*qnrA, qnrB, qnrS*
C33B-1	*E. coli*	Cão	Fezes	CTX >16 / CTL 0.125	>64	1	0,25	CTXM-1 / CTXM-2 / SHV	*qnrB*
C33C-1	*E. coli*	Cão	Fezes	CTX 32	>64	8	0,5	CTX-M	*qnrA / qnrB*
C33D-1	*E. coli*	Cão	Fezes	CTX >64	>64	1	0,38	CTXM-1	*qnrA, qnrB, qnrS*
C35A	*E. coli*	Cão	Fezes	CTX 32	8	1	0,5	SHV	*qnrB*
C39-1	*E. coli*	Cão	Fezes	CTX >64	>64	3	0.38	TEM	*qnrB*
C68A-2	*E. coli*	Cão	Saliva	CTX >16 / CTL 0.94	>64	16	8	CTXM-1 / CTXM-9 / TEM / SHV	*oqxA*
41AC1	*E. cloacae*	Cão	Fezes	CTX >64	>64	>64	32	CTXM- 1 / CTXM-15 / TEM / SHV	*qnrB / qnrS / qepA / aac(6')-Ib-cr/ oqxA*
41AN21	*E. cloacae*	Cão	Fezes	CTX >64	>64	2	1.5	CTXM-15 / CTXM-1	*qnrB / aac(6')-Ib-cr/ oqxA*
42AC	*E. coli*	Cão	Fezes	CTX 16	32	8	>64	SHV / TEM	*qnrB*
59AC1	*E. coli*	Cão	Fezes	CTX 4	>64	2	0,12	TEM / SHV	*qnrB*
76AC	*E. cloacae*	Cão	Fezes	CTX >64	>64	2	1.0	CTXM-15 / CTXM-1	*oqxA / qnrB*

O dendograma e perfil genotípico realizado por ERIC- PCR para cepas de *E. coli*, isoladas de fezes e salivas de cães e gatos produtoras de enzimas β-lactamases (ESBL), apresentou foi utilizado usando o programa *BioNumerics* (Applied Maths). Tolerância 1%, otimização 0,5% (Figuras 10 e 11).

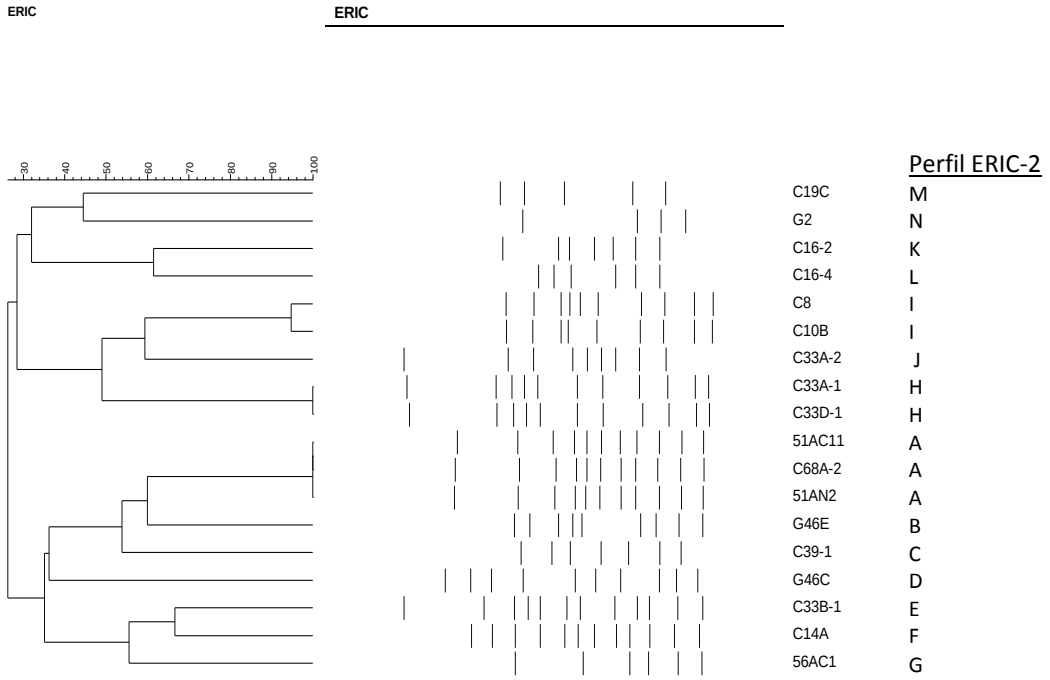


Figura 10: Isolados de *E. coli* portadores de genes ESBL com correlação clonal entre si.

Figura 11: Isolados de *Enterobacter cloacae* portadores do gene CTX-M-15 com correlação clonal entre si.

Após análise da caracterização da sorotipagem da cepa portadora do gene de resistência aos β-lactâmicos *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$, pôde-se constatar que a cepa C8 (*E. coli*), proveniente da saliva de um dos cães, é positiva para o sorogrupo O:25, grupo de maior endemicidade mundial em cepas virulentas. A partir deste dado foi realizada a análise de MLST (*Multilocus Sequence Typing*) da cepa por amplificação dos genes *housekeeping*, identificando desta forma a cepa como pertencente ao grupo ST 90.

Na etapa final do trabalho foi realizado o sequenciamento de cepas representante de cada um dos genes de resistência aos β-lactâmicos e fluoroquinolonas para uma consolidação dos resultados, bem como uma complementação do banco de cepas controles do laboratório.

Devido ao resultado de 23% de isolados apresentando resistência ao antibiótico Ertapenem, foi realizada uma análise adicional de PCR para verificar a presença de produção de enzima KPC no DNA destes isolados a partir dos primers específicos para o gene KPC-2. Nenhuma das cepas foi positiva para este gene, e desta forma descartamos a necessidade de testes adicionais.

5 DISCUSSÕES

Um estudo recente realizado pelo nosso grupo de pesquisa (BARBATO et al., 2012) revelou a presença de genótipos ESBL em 5,94% (*n*= 6) das cepas de uma coleção de bactérias Gram-negativas isoladas de urina de amostras de cães e gatos com infecção urinária. Desta coleção, 66,7% (*n*= 4) das cepas carregaram o gene $bla_{\text{CTX-M-2}}$, 16,7% (*n*= 1) o gene $bla_{\text{CTX-M-8}}$, e 16,7% (*n*= 1) o gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$. Assim, frente a estes dados inéditos no Brasil, o nosso interesse foi focado para investigar a prevalência do estado de portador ESBL e PMQR em animais de companhia.

Como antecedentes científicos internacionais, um estudo desenvolvido na China por Sun et al., em 2010, com 240 cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães e gatos, identificou 41,3% de cepas produtoras de ESBL pelo teste sinérgico de dupla difusão do disco. Foi detectada também a incidência de CTX-M-15 em 6 isolados (6,18% das cepas produtoras de ESBL), sendo que o grupo de CTX-M mais prevalente foi CTX-M-14, com 45 isolados. Outro trabalho descrito por Moreno et al. no Chile em 2008, identificou 14 cepas (20%) produtoras de ESBL, dentre 70 cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães e gatos tratados e não tratados com enrofloxacina, o que representa um índice alarmante de cepas resistentes aos antibióticos β-lactâmicos.

A partir destes resultados e resultados obtidos em trabalhos do grupo de pesquisa, resolvemos aumentar o campo de análise em medicina veterinária utilizando meios de culturas seletivos contendo ceftriaxona ou ácido nalidíxico em uma concentração que corresponderia à máxima concentração para determinar a sensibilidade a ambos antibióticos. O ácido nalidíxico foi escolhido de início a partir do fato de que a resistência às quinolonas por PMQR geralmente se associa com uma baixa CIM para fluoroquinolonas (LUO et al., 2011; GUNNELet al., 2009). No entanto o crescimento de bactérias que não apresentavam resistência considerável para os testes conseguintes aumentou de tal forma que optamos por mudar o antimicrobiano e realizamos a seleção com Ciprofloxacina (2 μg/ml) de acordo com a concentração inibitória mínima determinada na CLSI humana (2013) para otimizarmos a seleção de espécies portadoras dos genes PMQR.

Uma outra abordagem foi a inclusão de antibióticos de uso humano e veterinário para valorizar epidemiologicamente os resultados obtidos. Para realizar um trabalho inédito e diferenciar de trabalhos do gênero realizados em outros países, focalizamos a originalidade na pesquisa da microbiota oral e fecal, já que animais de estimação têm um estreito contato oro-fecal no que se refere à higiene ou características comportamentais, que contribuem para que

a região oral seja uma importante fonte de colonização transitória por microbiota intestinal. Estes animais, na condição de companhia para o ser humano, acabam sendo uma potencial fonte de disseminação, da mesma forma que podem adquirir este tipo de cepa resistente dos seres humanos e serem acometidos por doenças infecciosas. Mesmo para o animal de companhia, a colonização oral antecede uma possível colonização intestinal.

A estratégia de coletar amostras de fezes e cavidade oral de animais de companhia visou realizar uma avaliação epidemiológica devido à possibilidade de transmissão de bactérias multirresistentes que podem ser veiculadas por estes animais, podendo chegar a colonizar o ser humano e/ou ecossistemas relacionados. Neste ponto, um recente estudo feito por Sallem e colaboradores (2013) reportou os primeiros casos de *Escherichia coli* carregando genes $bla_{\text{CTX-M-1}}$ em amostras de fezes de animais de companhia. Este dado é extremamente importante para identificar o perfil epidemiológico deste tipo de resistência, além de sua disseminação entre animas de companhia e seus donos. Este trabalho contribui diretamente para esta questão, uma vez que foram encontradas cepas resistentes às cefalosporinas de amplo espectro de uso humano e animal, com perfil genotípico para produção de enzimas β-lactamases CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-15 em amostra de saliva de cão, indicando um alto risco de contaminação entre animais e humanos, considerando o contato frequente com a saliva devido aos costumes entre dono e animal.

Dentre as cepas que confirmaram a presença dos genes com resistência às fluoroquinolonas de origem plasmidial (PMQR), pôde-se observar um percentual alto e alarmante para a avaliação veterinária e também para uma avaliação de risco de contaminação no ambiente. Levando em consideração o fato de que as fluoroquinolonas são amplamente utilizadas em terapias antimicrobianas para infecção em animais, principalmente na clínica de pequenos animais como cães e gatos, um percentual de 54% das cepas testadas apresentando um ou mais genes de resistência à estes tipos de antimicrobiano reflete em uma propagação exponencial da resistência em bactérias da cavidade oral e intestinal, inviabilizando cada vez mais os tratamentos aplicados pela maioria dos veterinários nos dias de hoje.

Acredita-se que este quadro alarmante está sendo caracterizado devido ao uso exacerbado de antimicrobianos na terapia animal. A falta de atualização dos dados epidemiológicos de infecção causada por estes tipos de cepas entre veterinários, somada ao descontrole da venda de antibióticos sem prescrição médica para animais acarreta uma pressão seletiva entre os microrganismos presentes no meio, que acabam adquirindo por conjugação entre cepas portadoras intrínsecas de genes plasmidiais de resistência, estes plasmídeos e assim adquirindo uma multirresistência aos antibióticos existentes. Como

exemplo claro pode-se citar a *Klebsiella* spp., que conforme observação de Souza et al., (2014), é portadora intrínseca do complexo de genes de expressão de bomba de efluxo oqxAB. Neste trabalho e em alguns outros publicados em todo o mundo, relata-se a presença destes genes em cepas de *E. coli* e *Pseudomonas* spp., bactérias extremamente importantes causadoras de infecções graves.

Com a etapa de caracterização molecular completa, pode-se ter a confirmação da importância do animal doméstico como portador assintomático de bactérias com genes de resistência aos antibióticos de interesse clínico humano e animal. A maioria das amostras coletadas pertencia a animais que nunca passaram por tratamento contínuo ou profilático com estes antibióticos, o que direciona o foco da análise epidemiológica clínica para um problema de disseminação ambiental destes isolados resistentes.

A maioria dos animais que foram submetidos à coleta pertence a centros de acolhimento de animais de rua abandonados. Este fato também tem grande importância para a análise epidemiológica, uma vez que existe a possibilidade de colonização mediada pelo contato direto com outros animais, incluindo o ser humano, ou pela alimentação precária que consumiam, além da falta de higiene e das condições do ecossistema associado. Um exemplo de uma disseminação por contato direto entre animais de companhia poderia estar sendo representada pelo grupo dos gatos do Centro de Acolhimento, onde obtivemos uma porcentagem de 58,82% de isolados com fenótipo de resistência para fluoroquinolonas e cefalosporinas de amplo espectro em relação ao número de animais coletados, o que podemos considerar como um alto índice de portabilidade e transmissão.

A resistência aos antimicrobianos observada nos resultados fenotípicos é abrangente e abre espaço para discussões mais aprofundadas da disseminação de cepas multirresistentes no ambiente e nos animais. Como exemplo, podemos citar a tigeciclina, o ertapenem e a cefotaxima, que obtiveram os percentuais 33%, 23% e 68%, respectivamente, de cepas resistentes a estes antibióticos. Considerando o fato de que estes antimicrobianos não são utilizados em tratamento de infecções na medicina veterinária, pode-se deduzir que estes animais adquiriram nos ambientes em que já se instalaram ou transitaram, como a rua, lixões, ou até mesmo em residências onde habitam seres humanos. Um trabalho realizado por Martins e colaboradores em 2013com amostras coletadas de cães (saliva e urina), de humanos e do ambiente que compartilham, demonstrou que as mesmas cepas de *E. coli* carregando genes de resistência foram encontradas tanto nos cães como nos humanos e no ambiente. Este resultado confirma a teoria de que a transmissão pode ocorrer tanto de animais pra humanos, quanto de humanos pra animais e no próprio ambiente que compartilham.

Um trabalho realizado por Jean-Yves Madec e colaboradores em 2013 apresentou cepas de *E. coli*, não pertencentes ao grupo endêmico de virulência O:25/ST131, mas portadoras de plasmídeos caracterizados com o gene $bla_{\text{CTX-M-15}}$, ou seja, cepas já encontradas em amostras clínicas humanas, em amostras de fezes de bois. Estes dados reforçam a possibilidade da transferência de cepas endêmicas entre humanos e animais no ambiente, uma vez que animais de grande porte como bois e cavalos não possuem contato direto com o ser humano como cães e gatos.

Para as 17 cepas com fenótipo e genótipo de resistência aos β-lactâmicos caracterizadas, ampliamos o teste de concentração inibitória mínima para os antibióticos gentamicina, sulfametoxazol / trimetoprim, enrofloxacina e ciprofloxacina, diferentes antimicrobianos, para caracterizar o perfil MDR das cepas, conforme constatado na tabela 13.

Ainda em relação à tabela 13, a caracterização molecular também encontrou uma quantidade considerável de cepas MDR, que apresentaram positividade para os genes de resistência às duas classes de antimicrobianos testadas neste trabalho.

Com o a conclusão trabalho pudemos observar um índice maior do que o esperado de isolados bacterianos resistentes e intermediários em um número relativamente pequeno de amostras (considerando as porcentagens adquiridas de fenótipo de resistência para fluoroquinolonas e β-lactâmicos de amplo espectro). Consequentemente podemos refletir sobre a possibilidade de transmissão de bactérias resistentes para o ser humano, através do contato humano-animal direto e indireto, além da disseminação de genes de resistência para o meio ambiente.

6 CONCLUSÕES

- Houve predomínio de isolados de *Escherichia coli* resistentes as cefalosporinas de amplo espectro e Q/FQ na microbiota oral e intestinal.
- Dos isolados analisados quanto ao genótipo PMQR, houve predomínio do genótipo *qnrA*.
- Os resultados apresentados são inéditos no Brasil, constituindo o primeiro reporte de CTX-M em bactérias Gram-negativas isoladas da microbiota comensal de animais de companhia assintomáticos.
- Animais de companhia podem ser portadores de bactérias apresentando fenótipo resistência as principais cefalosporinas e Q/FQ de uso humano e veterinário mediada pela produção de ESBL e PMQR.
- Bactérias que fazem parte da microbiota comensal podem ter um papel importante na disseminação de genes de resistência aos antibacterianos de uso humano e animal. Nesta condição, o hospedeiro colonizado pode ser um portador assintomático que contribui com a disseminação do agente bacteriano para outros hospedeiros e/ou ecossistemas associados, ou em uma condição desfavorável o hospedeiro pode adquirir uma infecção endógena, com prognóstico desfavorável decorrente da falha terapêutica mediada pela expressão de genes de resistência para antibacterianos considerados de última escolha terapêutica.
- Estudos adicionais são necessários para elucidar o motivo pelo qual animais de companhia têm chegado a serem colonizados por bactérias produtoras de ESBL e/ou PMQR.

REFERÊNCIAS*

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. **Rev. Infect. Dis.**, v. 146, p. 837, 1988.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA. Mecanismo de resistência aos antibióticos. Brasília. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/quinolonas2.html>. Acesso em: 14 fev. 2013.

ALITHEEN, N. B. et al. Random amplified polymorphic DNA-PCR and ERIC PCR analysis on *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles in Padang, Indonesia. **International Food Research Journal**, v. 16, p. 141-150, 2009.

AMBLER, R.P. The Structure of Beta-Lactamases. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B,** v.289, 1980. doi:, 10.1098/rstb.1980.0049.

ANDRIOLE, VICENT T. **The Quinolones.** 2nd ed. California: Academic Press, 1998.

BALL, P. The quinolones: history and overview. In: ANDRIOLE, V. T. 2 ed. **The quinolones**. 2 ed. San Diego, California: Academic Press, 1998. p. 1–28.

BAO-TAO, L.; WANGT, X.M.; LIAO, X.P.; SUN, J.; ZHU, H.Q.; CHEN, X.Y.; LIU, Y.H. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *oqxAB* and *aac(6')-Ib-cr* and extended-spectrum β-lactamase gene $bla_{CTX\text{-}M\text{-}24}$ co-located on the same plasmid in one *Escherichia coli* strain from China. **J. Antimicrobial. Chemother**., v. 66, p. 1638-1658, 2011.

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.

BARBATO, L. Detecção e caracterização de bactérias Gram-negativas produtoras de β-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) isoladas de animais de companhia e búfalos no estado de São Paulo. In: ICAAC INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 52., 2012, San Francisco. **Postêr…** San Francisco, 2012.

BAUER, A. W. Antibiotic Susceptibility testing by a standardized Single Disc Method. **Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BAUERNFEIND, A. Plasmidic extended spectrum resistance to beta-lactams in nosocomial infections. **Kansenshogaku Zasshi,** v. 70, n. 12, p. 1211-1219, 1996.

BLACK, J. G. **Microbiology**: principles and applications. 3rd ed. Upper Sadle River, NJ: Prentice Hall, 1996.

BLONDEAU, J. M. et al. In vitro killing of *Escherichia coli*, *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* by enrofloxacin in combination with its

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

active metabolite ciprofloxacin using clinically relevant drug concentrations in the dog and cat. **Veterinary Microbiology**, v. 155, n. 2–4, p. 23, 2012.

BRISSE, G. et al. Institut Pasteur LST Databases. Disponível em: <www.pasteur.fr/mlst>. Acesso em: 25 mar. 2014.

BOLON, M. K. The newer fluoroquinolones. **Infect. Dis. Clin**., v. 95, n. 4, p. 793-817, 2011.

BONELLI, R. et al. Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. **Drug Resist**. **Updat.,** 2014. In press.

BONNET, R. et al. A novel CTX-M β-Lactamase (CTX-M-8) cefotaxime-resistant enterobacteriaceae isolated in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother**.,v. 44, n. 7, p. 1936, 2000. DOI: 10.1128/AAC.44.7.1936-1942.2000.

BONNET, R.; DUTUOR, C.; SAMPAIO, J. L. M.; CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, J. Novel Cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240. **Antimicrob. Agents Chemother**., v. 45, n. 8, p. 2269-2275, 2001.

BOUCHER, H. W. et al. Badbugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis**., v. 48, n. 1, p. 1-12, 2009.

BROWN, S. A. Fluoroquinolones in animal health. **J. Vet. Pharmacol. Ther.,** v. 19, n. 1, p. 1-14, 1996.

BUENO, M. F. et al. Coproduction of 16S rRNA Methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M Group Extended-Spectrum β-Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**., v. 57, n. 5, p. 2397-400, 2013. doi: 10.1128/AAC.02108-12.

BUSH, K. et al. A Functional Classification Scheme for β-Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.

BUSH, K. et al. Updated Functional Classification of β-Lactamases. **Antimicrob. Agents. Chemother**., v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.

CARBONELLE, E. et al. Applications of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory. **Med. Sci. (Paris)**, v. 27, n. 10, p. 882-888, 2011.

CASTANHEIRA, M. et al. Evaluation of quinolone resistance-determining region mutations and efflux pump expression in *Neisseria meningitidis* resistant to fluoroquinolones. **Diagnostic Microbiology and Infectous Diseases**, v. 72, n. 3, p. 263-266, 2012.

CASTANHEIRA, M. et al. First Report of Plasmid-Mediated *qnrA1* in a Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli* Strain in Latin America. **Antimicrobial Agents and Chemoteraphy**, v. 51, n. 4, p. 1527-1529, 2007.

CASTANHEIRA, M. et al. Antimicrobial Activities of Tigecycline and Other Broad-Spectrum Antimicrobials Tested against Serine Carbapenemase and Metallo-Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Report from the SENTRY Antimicrobial. Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemoteraphy**, v. 52, n. 2, p. 570–573, 2008.

CAVACO, L. M. et al. *qnrD*, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and *Bovis morbificans* Strains of Human Origin. **Antimicrobial Agents and Chemoteraphy**, v. 53, n. 2, p. 603–608, 2009.

CARATOLLI, A. et al. Extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. **Antimicrob. Agents Chemother.,** v. 49, n. 2, p. 833–835, 2005.

CANTÓN, R. et al. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. **Front. Microbiol.**, v. 3, p. 110, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00110.

CENTRO DE PESQUISA SOBRE O GENOMA HUMANO E CÉLULAS-TRONCO. Sequenciamento. São Paulo. Disponível em <http://www.genoma.ib.usp.br/?page_id=56> Acesso em: 5 mar. 2014.

CEREDA, R. F. et al. Antimicrobial activity of ceftobiprole against gram-negative and gram-positive pathogens: results from INVITA-A-CEFTO Brazilian study. **Braz. J. Infect. Dis**., v. 15, n. 4, p. 339-348, 2011.

CERGOLE-NOVELLA, M. C. et al. First description of *bla*(CTX-M-14)- and *bla*(CTX-M-15)-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **Microb. Drug. Resist**., v. 16, n. 3, p. 177-184, 2010.

CHAGAS, T. P. Diversity of genotypes in CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in different hospitals in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.,** v. 15, n. 5, p. 420-425, 2011.

CHARNOCK, C. et al. Toxin Production and Antibiotic Resistances in *Escherichia coli* Isolated from Bathing Areas Along the Coastline of the Oslo Fjord. **Curr Microbiology**, 2014. In press.

CLERMONT, O. et al. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555-4558, 2000.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environ. Microbiol**. **Reports**, v. 66, n. 1, p. 58-65, 2013.

CLÍMACO, E. C. et al. CTX-M-producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years? **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**., v. 68, n. 2, p. 186-189, 2010. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.05.013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Quality Manual; Third Edition. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2013.

_____. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M31-A3. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008.

_____. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard-Fourth Edition. CLSI document M31-A3. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2013.

COSTA, D. et al. Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. **J. Antimicrob. Chemother**., v. 54, n. 5, p. 960–961, 2004.

COOPER, J. E.; FEIL, E. J. Multilocus sequence typing — what is resolved? **Trends Microbiol**., v. 12, n. 8, p. 373–377, 2004.

CUENCA, F. F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 22, n. 6, p. 355-360, 2004.

DE JONG, A. et al. Fluoroquinolone resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* from healthy livestock and poultry in the EUA. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 2, p. 239-245, 2011.

DIWAN, V. et al. Identification of extended-spectrum β-lactamase and quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from hospital wastewater from central India**. J. Antimicrobial. Chemotherapy,** v. 67, n. 4, p. 857-859, 2012. DOI: 10.1093/jac/dkr564.

DOMAGALA, J. M. et al. New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. **J. Med. Chem.,** v. 29, n. 3, p. 394-404, 1986.

DONATI, V. et al. Extended-Spectrum-Beta-Lactamases, AmpC Beta-Lactamases and Plasmid Mediated Quinolone Resistance in *Klebsiella* spp. from Companion Animals in Italy. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. e 90564, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0090564.

DONSKEY, C. J. Antibiotic regimens and intestinal colonization with antibiotic-resistant gram-negative bacilli. **Clin. Infect. Dis**., v. 1, n. 43, p. 62-69, 2006.

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. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.47, n. 12, p. 3724-3732, 2003.

EWERS, C. et al. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-β-lactamaseproducing *Escherichia coli* among companion animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 65, n. 4, p. 651-660, 2010. DOI: 10.1093/jac/dkq004.

FARMER III, J. J. et al. Enterobacteriaceae: introduction and identification. In: MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 9th ed. Washington: American Society for Microbiology, 2007. v. 1, cap. 42, p. 649-669.

FERNANDES, R. et al. Molecular Characterization of ESBL-Producing Enterobacteriaceae in Northern Portugal. **Scientific World Journal,** v. 13, n. 782897, 2014. DOI: 10.1155/2014/782897.

FERREIRA, J. C. et al. Detection of chromosomal $bla_{\text{CTX-M-2}}$ in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens. **Clinical Microbiology Infection**, 2014. In press.

FERREIRA, W. et al. *Neisseria gonorrheae* produtoras de β-lactamase resistentes a azitromicina em Manaus, Amazonas, Brasil. **DST – Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 16, n. 2, p. 28-32, 2004.

FERRARI, R. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* spp. strains isolated in Brazil. **J. Infect. Dev. Ctries**., v. 5, n. 6, p. 496-498, 2011.

FIGUEIREDO, E. A. P. et al. *Pseudomonas Aeruginosa*: Frequência de Resistência a Múltiplos Fármacos e Resistência Cruzada entre Antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 4, p. 421-427, 2007.

FIOCCHI, C. et al. Microbiota intestinal - Sua importância e função. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 100, n. 3, p. 30-38, 2012.

FONSECA, E. L. et al. New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1129-1131, 2008.

FONTES, L.; LINCOPAN, N. et al. Dissemination of $bla_{\text{CTX-M}}$, *qnr*, $bla_{\text{SPM-1}}$ and *RmtD* Genes in an Urban River, Brazil. In: ICAAC INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 51., 2011, San Francisco. **Postêr…** San Francisco, 2011.

GALES, A. C. et al. Activity and spectrum of 22 antimicrobial agents tested against urinary tract infection pathogens in hospitalizated patiens in Latin America: report from the second year of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998). **Emerging Infectious Diseases**, v. 45, n. 3, p. 295-303, 2000.

GAO, C. H. et al. Personalized therapeutics for levofloxacin: a focus on pharmacokinetic concerns. **Ther. Clin. Risk. Manag**., v. 27, n. 10, p. 217-227, 2014.

GELLERT, M. et al. Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. In: ANDRIOLE, V. T. (Ed.). **The quinolones**. 2nd ed. San Diego, California: Academic Press, 1977.

GOOTZ, T. D. et al. Fluoroquinolone antibacterials: SAR, mechanism of action, resistance and clinical aspects. In: Andriole V T., editor. The quinolones. 2 ed. San Diego, California: **Academic Press**, 1977.

GREENE, C. E.; BUDSBERG, S. C. Veterinary use of quinolones. In: HOOPER, D. C. et al. **Quinolone antimicrobial agents**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1993. p. 473-488.

GUTIERREZ, J. A. et al. Repercusiones em la salud pública de la resistência a quinolonas em bactérias de origen animal. **Revista Española de Salud Pública**, v. 75, n. 4, p. 313-320, 2001.

GUILLARD, T. et al. Rapid Detection of *aac(6)-Ib-cr* Quinolone Resistance Gene by Pyrosequencing. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 48, n. 1, p. 286-289, 2010.

GUNNEL, M. et al. Mechanisms of Resistance in Nontyphoidal *Salmonella enterica* Strains Exhibiting a Nonclassical Quinolone Resistance Phenotype. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 53, n. 9, p. 3832-3836, 2009.

HALL, B. G. et al. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 55, n. 6, p. 1050-1051, 2005.

HOOPER, D. C. Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. **Emerging Infectious Diseases,** v. 7, n. 2, p. 337-341, 2001.

HOOPER, D. C. Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases,** v. 15, n. 32, p. 9–15, 2001.

HOOPER, D. C.; WOLFSON, J. S. Quinolone Antimicrobial Agents. **American Society for Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1177, 1993.

INSTITUT PASTEUR. *Escherichia coli* MLST database. Paris. Disponível em < http:// www.pasteur.fr/mlst//primers_Ecoli>. Acesso em: 25 mar. 2014.

JACKSON, L. C. et al. Quinolonas y terapia antimicrobiana. **Acta Medica**, v. 8, n. 1, p. 58-65, 1998.

JACOBY, G. A. et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. **Antimicrobial Agents and Chemoteraphy**, v. 47, n. 2, p. 559–562, 2003.

JACOBY, G. A. et al. *QnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. **Antimicrobial Agents and Chemoteraphy,** v. 50, n. 4, p. 1178–1182, 2006.

JACOBY, G. A. et al. Temporal Appearance of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes. **Antimicrobial Agents and Chemoteraphy**. v. 53, n. 4, p. 1665- 1666, 2009.

JACOBY, G. A. et al. **ß-Lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes**. Burlington. Disponível em: <http://www.lahey.org/studies>. Acesso em: 18 abr. 2014.

JIANG, Y.; ZHOU, Z. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(60)-Ib-cr* in extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 61, n. 5, p. 1003-1006, 2008.

KIM, H. B. et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. **Antimicrob Agents Chemotheraphy,** v. 53, n. 2, p. 639-645, 2009.

KIRBY, W. M. M. Extraction of a highly potent penicillin inativator from penicillin resistant Staphylococci. **Science,** v. 99, n. 2579, p. 452-453, 1944.

KORZENIEWSKA, E. et al. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive Enterobacteriaceae in municipal sewage and their emission to the environment. **J. Environ. Manage.,** v. 15, n. 128, p. 904-911, 2013. DOI: 10.1016/j.jenvman.2013.06.051.

KNABEL, S. J. et al. Sequence typing confirms that a predominant *Listeria monocytogenes* clone caused human listeriosis cases and outbreaks in Canada from 1988-2010. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 50, n. 5, p. 1748-1751. DOI:10.1128/JCM.06185-11.

LEE, M. et al. Quinolones: which generation for which microbe? **West. J. Med.**, v. 170, n. 6, p. 359-361, 1999.

LESCAT, M. et al. Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity in host-dependant population structure. **Enviromental Microbiology Rep**., v. 5, n. 1, p. 49-57, 2013.

LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia.** 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

LIU, J. H. et al. Coprevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants *QepA, Qnr,* and *aac(6')-Ib-cr* among 16S rRNA Methylase RmtB-Producing *Escherichia coli* Isolates from Pigs. **Antimicrobial Agents and Chemoteraphy**, v. 52, n. 8, p. 2992-2993, 2008.

LIVERMORE, D. M. et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. **J. Antimicrob. Chemother.,** v. 59, n. 2, p. 165-174, 2007.

LIVERMORE, D. M.; PEARSON, A. Antibiotic resistance: location, location, location. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 13, n. 7, p. 7-16, 2007.

LOPES, A. A.; SALGADO, K. Aumento da frequência de resistência à norfloxacina e ciprofloxacina em bactérias isoladas em uroculturas. **Rev. Ass. Med. Brasil.,** v. 44, n. 3, p. 196-200, 1998.

LOPES, A. C. et al. *bla*(CTX-M-2) and *bla*(CTX-M-28) extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, p. 105, n. 2, p. 163-167, 2010.

LUO, Y. et al. Prevalence of β-lactamases and 16S rRNA methylase genes amongst clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants. **International Journal of Antimicrobial Agents,** v. 37, n. 4, p. 352–355, 2011.

MADEC, J. et al. Non-ST131 *Escherichia coli* from cattle harbouring human-like *bla*CTX-M-15-carrying plasmids. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 67, n. 3, p. 578–581, 2011.

MADEC, J. et al. Characterization of *bla*CTX-M IncFII plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. **J. Antimicrob. Chemother.,** v. 68, n. 12, p. 2797-2801, 2013. doi: 10.1093.

MADIGAN, M. et al. **Microbiologia de Brock**. 12 ed**.** Los Angeles: Editora Artmed, 2012.

MAIDEN, C. J. M.; BYGRAVES, J. A. *Multilocus sequence typing*: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.

MAMMERI, H. Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* in Europe. **Antimicrobial Agents and Chemoteraphy**, v. 49, n. 1, p. 71–76, 2005.

MANZETTI, S. et al. The environmental release and fate of antibiotics. **Mar. Pollut. Bull.***,* v. 15, n. 79, p. 7-15, 2014. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2014.01.005.

MARTINEZ-MARTINEZ, L. et al. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **Lancet**, v. 351, n. 9105, p. 797-799, 1998.

MARTINS, L. et al. Common phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns found in a case study of multirresistant *E. coli* from cohabitant pets, humans, and household surfaces. **National Environmental Health Association**, v. 75, n. 6, p. 74-81, 2012.

MAVROIDI, A. et al. Successful control of a neonatal outbreak caused mainly by ST20 multidrug-resistant SHV-5-producing *Klebsiella pneumoniae*, Greece. **BMC Pediatr. P.,** v. 14, n. 1, p. 105, 2014.

MELO, L. C. et al. Commensal microbiota of companion animals as reservoirs of *bla*CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes. In: ICAAC INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 53., 2013, Denver. **Postêr…** Denver, 2013.

MERINO, J. M. et al. Sensibilidad microbiana de *Escherichia coli* em infecciones urinarias extrahospitalarias. **Actas. Urol. Esp.**, v. 27, n. 10, p. 783-787, 2003.

MICENKOVÁ, L. et al. Bacteriocin-encoding genes and ExPEC virulence determinants are associated in human fecal *Escherichia coli* strains. **BMC Microbiol.**, v. 14, n. 1, p. 109, 2014.

MINARINI, L. A. R. et al. First report of plasmid-mediated resistance to quinolones and cefotaxime in *Enterobacter cloacae* strain isolated from an outpatient in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemoteraphy**, v. 51, n. 1, p. 401-402, 2007.

MINARINI, L. A. R. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 474, 478, 2008.

MOURA, R. **Estudo das relações entre Amostras de *Escherichia coli* enetropatogênicas atípica de origem animal e humana**. 2009. 152 f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MORENO, A.; BELLO, H.; GUGGIAANA, D.; DOMÍNNGUEZ, 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, n. 1-2, p. 203-208, 2008.

MURRAY, P. R.; ROSENRTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

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, n. 6, p. 1393–1394, 2008.

NAVARRO, F. et al. Emergence of clinical *Escherichia coli*isolates with decreased susceptibility to ceftazidime and synergic effect with co-amoxiclavulanic due to SHV-1 hyperproduction. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 4, p. 535-538, 1998.

NIJSTEN, R.; LONDON, N.; BOGAARD, A.; STOBBERINGH, V. D. Antibiotic resistance of Enterobacteriaceae isolated from the faecal flora of fattening pigs. **Vet. Quart**., v. 15, n. 4, p. 152-157, 1993.

NOGUEIRA, K. D. et al. Emergence of extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil**. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin**., v. 32, n. 2, p. 87-92, 2014.

OKUBO, T. et al. Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 4, p. 243-249, 2014.

OSUGUI, L. et al. Virulence genotypes, antibiotic resistance and the phylogenetic background of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract Infections of dogs and cats in Brazil. **Veterinary Microbiology,** v. 171, n. 1-2, p. 242-247, 2014. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.03.027.

OTEO, J. et al. Inhibitor-resistant TEM and OXA-1 producing *Escherichia coli* isolates resistant to amoxicillin-clavulanate are more clonal and possess lower virulence gene content than susceptible clinical isolates. **Spanish Network for Research in Infectious Diseases**, 2014. In press.

PADOVEZE, M. C.; Freire M. P.; Silveira F. P.; Paterson D. L. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.,** v. 52, n. 5, p. 1790-1793, 2008.

PAIVA, M. C. et al. The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6´)-Ib-cr* genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 687-689, 2012.

PANTOZZI, F. L. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 42, n. 1, p. 49-52, 2010.

PARK, Y. J., LEE, S., KIM, Y. R., OH, E. J., WOO, G. J., LEE, K. Occurence of extended-spectrum β-lactamases and plasmid-mediated AmpC β-lactamases among Korean isolates of *Proteus mirabilis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 156-158, 2006.

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, n. 11, p. 3953-3955, 2006.

PAULA, A. I. **Perfil Fenotípico e Genotípico de *Escherichia coli* Resistente a Quinolonas Isoladas de Hemocultura.** 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2011.

PEIRANO, G. et al. Molecular characteristics of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. **Clin. Microbiol. Infect**., v. 17, n. 7, p. 1039–1043, 2011.

PEREIRA, A. S., et al. Evaluation of the Susceptibility Profiles, Genetic Similarity and Presence of qnr Gene in *Escherichia coli* Resistant to Ciprofloxacin Isolated in Brazilian Hospitals. **Braz. J. Infect. Dis**., v. 11, n. 1, p. 40-43, 2007.

PEYMANI, A. et al. Emergence of TEM, SHV, and CTX-M-Extended Spectrum b-Lactamases and Class 1 Integron Among *Enterobacter cloacae* Isolates Collected from Hospitals of Tehran and Qazvin, Iran. **Microbial Drug Resistance**, 2014. In press.

POLOTO, M. et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring $bla_{\text{CTX-M-2}}$, $bla_{\text{GES-1}}$ and $bla_{\text{GES-5}}$, $bla_{\text{IMP-1}}$ and $bla_{\text{SPM-1}}$ causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC Infect. Dis**., v. 3, n. 12, p. 176, 2012.

PULCINI, C.; BUSH K. et al. Forgotten Antibiotics: An Inventory in Europe, the United States, Canada, and Australia. **Reviews of anti-infective agents**, v. 54, n. 2, p. 268-274, 2012.

QUEIROZ, M. L. et al. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases, antimicrobial resistance genes, and plasmid content in *Escherichia coli* isolates from different sources in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis.,** v. 74, n. 1, p. 91-94, 2012. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.019.

RAMOS, P. I. et al. Pyrosequencing-based analysis reveals a novel capsular gene cluster in a KPC-producing *Kl*ebsiella *pneumoniae* clinical isolate identified in Brazil. **BMC Microbiol.,** v. 11, n. 12, p. 173, 2012. DOI: 10.1186/1471-2180-12-173.

RIBEIRO, A. R. et al. Resistência antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *Enterica Sorovar* Hadar isoladas de carcaças de frango. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 73, n. 3, p. 357-360, 2006.

ROSSI, F. et al. Carbapenem stewardship – positive impact on hospital ecology. **Brazil Journal of Infection Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2011.

RUIZ, E.; SALENZ, Y. *Qnr, aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location**. J. Antimicrob. Chemother**., v. 67, n. 4, p. 886-897, 2012. DOI:10.1093/jac/dkr548.

SABRY, A. H. et al. Zoonoses from cats: with special reference to Egypt. **Journal of Egypt Society Parasitology,** v. 43, n. 2, p. 429-446, 2013.

SADER, H.S., GALES, A.C., et al. Sensibilidade à antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório de pacientes com infecções respiratórias adquiridas na comunidade: resultados brasileiros do Programa SENTRY de Vigilância de Resistência a Antimicrobianos dos anos de 1997 e 1998. **Journal of Pneumology**, v. 27, n. 1, p. 25-34, 2001.

SALLEM, et al. First Detection of CTX-M-1, CMY-2, and QnrB19 resistance mechanisms in Fecal *Escherichia coli* isolates from healthy pets in Tunisia. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 2, p. 98-102, 2013.

SCHINK, A. et al. Detection of *qnr* genes among *Escherichia coli* isolates of animal origin and complete sequence of the conjugative qnrB19-carryng plasmid pQNR2078. **Journal of Microbiology Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1999-1102, 2012. DOI: 10.1093/jac/dks024.

SCHLUTTER, A. et al. IncH-type plasmid harboring 1 the *blaCTX-M-15, blaDHA*-1, and *qnrB4* genes recovered from animal isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 2014. In press.

SHAHEEN, B. W. et al. Evaluation of the contribution of *gyrA* mutation and efflux pumps to fluoroquinolone and multidrug resistance in pathogenic *Escherichia coli* isolates from dogs and cats**. Antimicrobial Journal of Veterinary Resistance**, v. 72, n. 1, p. 25-32, 2011.

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. 2, n. 48, p. 91-99, 2012.

SOUNA, D. et al. Molecular typing and characterization of TEM, SHV, CTX-M, and CMY-2-lactamases in *Enterobacter cloacae* strains isolated in patients and theirhospital environment in the west of Algeria. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 44, n. 4, p. 146-152, 2014.

SOUZA, M. et al. β-lactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **News Lab.,** v. 63, p. 152–154, 2004.

SOUZA, R. A.; PITONDO-SILVA, A. *Multilocus Sequence Typing* para identificação de linhagens atípicas de *Yersinia* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, São Paulo. **Abstracts...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.

SOUZA, R. R. **Pesquisa de genes de resistência a quinolonas em bacilos Gram negativos de origem clínica e ambiental.** Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SUCHODOLSKI, J. et al. Intestinal Microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. **Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.**, v. 41, n. 2, p. 261-272, 2011.

SUN, Y. et al. High prevalence of $bla_{\text{CTX-M}}$ extended-spectrum β-lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. **Clin. Microbiol. Infect.,** v. 16, n. 9, p.1475-1481, 2010.

TANSARLI, G. et al. Proportion of extended-spectrum b-lactamase (ESBL)-producing isolates among Enterobacteriaceae in Africa: evaluation of the evidence—systematic review. **J. Antimicrob. Chemother**., v. 69, n. 5, p. 1177-1184.

TOLLENTINO, F. M. et al. 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, n. 1, p. 7-16, 2011.

TAUSOVA, D. et al. *Escherichia coli* with extended-spectrum B-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. **J. Antimicrob. Chemotherapy**., v. 67, n. 5, p. 1103-1107. DOI: 10.1093/jac/dks017.

TEO, J. et al. Risk Factors, Molecular Epidemiology and Outcomes of Ertapenem-Resistant, Carbapenem-Susceptible Enterobacteriaceae: A Case-Case-Control Study. **PLoS One**, v. 7, n. 3, e34254, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0034254.

TOLLENTINO, F. M. et al. 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), b*la*(SHV-38), and *bla*(CTX-M-15) in Brazil. **Microb. Drug. Resist.,** v.17, n. 1, p.7-16, 2010.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia.** 10. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 718 p.

TRAN, J. H. et al. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 99, n. 8, p. 5638-5642, 2002.

TZOUVELEKIS, L. et al. SHV-type beta-lactamases. **Curr. Pharm. Des.**, v. 5, n. 11, p. 847-864, 1999.

VALADBEIGI, H. et al. Genomic diversity and virulence genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Clin. Lab**., v. 60, n. 3, p. 363-367, 2014.

VASCONCELOS, F. R. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 405-410, 2010.

VÁSQUEZ, J. A.; BERRÓNB, S. *Multilocus sequence typing:* el marcador molecular de la era de Internet. **Enfermedades infecciosas y Microbiologia Clínica**, v. 22, n. 2, p. 113-120, 2004.

VELDMAN, K. et al. Enterobacteriaceae resistant to third-generation cephalosporins and quinolones in fresh culinary herbs imported from Southeast Asia. **International Journal of Food Microbiology,** v. 177, p. 72–77, 2014. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.014.

VERSALOVIC, J. et al. Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 19, n. 24, p. 6823-31, 1991.

VIANA, A. et al. Extended-spectrum b-lactamases in Enterobacteriaceae isolated in Brazil carry distinct types of plasmid-mediated quinolone resistance genes. **Journal of Medical Microbiology,** v. 62, n. 9, p. 1326–1331, 2013.

VILLA, L. M. et al. Resistance to antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* in Colombian hospitals. **Rev. Chilena. Infectol**., v. 30, n. 6, p. 605-610, 2013.

WANG, M. et al. Emerging Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Associated with the *qnr* Gene in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in the United States. **Antimicrobial Agents Chemoteraphy,** v. 48, n. 4. p. 1295–1299, 2004.

WANG, M. et al. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Clinical Isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. **Antimicrobial Agents Chemoteraphy**, v. 47, n. 7, p. 2242–2248, 2003.

WANG, M. et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC,* found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial Agents Chemoteraphy**, v. 53, n. 5, p. 1892-1897, 2009.

WILLIAMS, J. D. β-Lactamases and β-lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, n. 1, p. 3-7, 1999.

WINTERSDORFF, C. et al. High Rates of Antimicrobial Drug Resistance Gene Acquisition after International Travel, the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases,** v. 20, n. 4, p. 649-657, 2014.

WEBBER, M. et al. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. Vet. Res., v. 32, n. 3-4, p. 275–284, 2001. Published erratum appears in **Vet. Res.**, v. 32 n. 6, p. 623, 2001.

WELLS, J. et al. Meat Science and Muscle Biology Symposium: *Escherichia coli* O157:H7, diet, and fecal microbiome in beef cattle**. J. Anim. Sci.**, v. 92, n. 4, p. 1345-1355, 2014.

WOERTHER, P. L. et al. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. **Clin. Microbiol. Rev**., v. 26, n. 4, p. 744-758, 2003.

WOLFSON J. S.; HOOPER D. C. The Fluoroquinolones: Structures, Mechanisms of Action and Resistance, and Spectra of Activity In Vitro. **Antimicrobial Agents Chemoteraphy**, v. 28, n. 4, p. 581-586, 1985.

XUE, X. et al. Brief Communication: Detection of Clinical *Klebsiella pneumonia* Isolates from China Containing Transferable Quinolone Resistance Determinants Exhibiting Resistance to Both Aminoglycoside and β-lactams. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 44, n. 2, p. 232-234, 2014.

YAMANE, K. et al. New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, *QepA*, Found in an *Escherichia coli* Clinical Isolate. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3354-3360, 2007.

ZAO, J. Y. et al. Coastal Seawater bacteria harbor a large reservoir of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Jiaozhou Bay, China. **Microb. Ecol.,** v. 64, n. 1, p. 187-199, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Resumo submetido, aceito e apresentado em forma de pôster noICAAC - Conferência Internacional sobre Agentes Antimicrobianos e Doenças Infecciosas, no ano de 2014, em Denver – Co (EUA)

Commensal Microbiota of Companion Animals as Reservoirs of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Genes

MELO, L.C.; BARBATO, L.; LEIGUE, L. MOURA, R.; AGUILAR, P.; LINCOPAN, N.H.

Background: Pets may be reservoirs bacterial beta-lactamase producing wide-spectrum (ESBL) and / or with a mechanism of acquired resistance to quinolones plasmid-encoded (PMQR = *qnr, QEP, aac (6 ')-1b-cr and oqx*).

Objetivos: This research project aims to determine the prevalence of gram-negative and ESBL-producing PMQR on pets to investigate the potential role of these animals as asymptomatic carriers.

Methods: During the year 2012 were collected 216 samples (feces and saliva) of pets housed in reception centers and the Center for Zoonosis Control of São Paulo city. Gram-negative bacteria were isolated on selective media were identified and studied biochemically as the phenotypes and genotypes of resistance to antibacterial quinolones / fluoroquinolones (Q/FQ) and beta-lactamic antibiotics of wide spectrum, including cephalosporins and carbapenems. In a next step we'll evaluate the clonal relationship between the predominant species, and additionally for *Escherichia coli* phylogenetic group will investigate the virulence.

Results: Of total gram-negative bacteria isolated (n = 128), 104 (81.25%) had a phenotype suggesting PMQR (E. coli 33.7%> K. pneumoniae, 4.8%> Pseudomonas spp. 8.7%), while 67 isolates (52.34%) exhibited a phenotype suggesting ESBL (*E. coli*, 38.8%>*K. pneumoniae*, 7.5%>*P. aeruginosa* 9.0%). Partial data on identification by PCR genotype ESBL has confirmed the presence of blaCTX-M 6/9 *E. coli*, 1/2 *K. pneumoniae* 1/1 *Pseudomonas* spp. As for partial identification of determinants of resistance to quinolones PMQR revealed the presence of genes qnr 15 isolates of *E. coli*. Although the study has not been completed, the results are unprecedented in Brazil, constituting the world's first reporting of Pseudomonas spp. producing CTX-M recovered Company.

Conclusion: Bacteria that are part of the commensal flora may have an important role in the spread of antimicrobial resistance genes. In this condition, the host can be colonized an asymptomatic carrier that contributes to the spread of bacterial agent to other hosts and / or associated ecosystems, or in an unfavorable situation the host can acquire an endogenous infection with unfavorable prognosis due to treatment failure mediated expression of genes conferring resistance to antibacterial therapy considered last choice.

APÊNDICE B - Perfil de Resistência a partir da técnica de disco – difusão de isolados adquiridos de amostras de fezes e saliva de gatos , coletadas em 2012.

S: Sensível, I: Intermediário, R: Resistente.

Espécie	AMOSTRA	AMC		CTX		CTF		ATM		CAZ		CIP		SUT		ETP		PEF		LVX		NOR		NAL		ENO		MXF		GEN		CFO		OFX		TIG		AMI	
Pseudomonas pseudoalcaligenes	**G1b1**	24	S	22	R	23	S	20	I	25	S	20	I	29	S	31	S	13	R	19	S	20	S	10	R	21	I	20	S	24	S	24	S	16	S	20	S	20	I
Klebsiella ozaenae	**G9-KLB**	23	S	23	I	22	S	26	S	24	S	12	R	25	S	23	S	15	R	17	S	18	S	12	R	16	R	15	R	13	I	19	S	13	I	14	R	13	R
Escherichia coli	**G10A2**	23	S	21	R	16	R	17	R	20	I	20	I	23	S	27	S	15	R	17	S	19	S	0	R	20	I	20	S	23	S	25	S	14	I	20	S	24	S
Escherichia coli	**G13**	21	S	31	S	25	S	28	S	26	S	35	S	28	S	30	S	25	S	30	S	30	S	19	S	30	S	27	S	12	R	23	S	25	S	23	S	21	S
Escherichia coli	**G14A**	13	R	26	S	24	S	30	S	25	S	30	S	28	S	28	S	24	S	25	S	27	S	21	S	26	S	23	S	20	S	13	R	24	S	20	S	22	S
Escherichia coli	**G17**	25	S	32	S	27	S	33	S	28	S	30	S	26	S	32	S	17	I	25	S	29	S	0	R	25	S	27	S	17	S	26	S	22	S	23	S	16	R
Pseudomonas pseudoalcaligenes	**G18**	24	S	21	R	17	R	15	R	20	I	22	S	26	S	30	S	15	R	19	S	21	S	9	R	20	I	20	S	21	S	21	S	18	S	22	S	26	S
Pseudomonas aeruginosa	**G20-B**	0	R	19	R	16	R	23	S	26	S	30	S	0	R	10	R	15	R	24	S	24	S	24	S	0	R	20	S	15	S	0	R	17	S	11	R	23	S
Escherichia coli	**G21A**	24	S	32	S	26	S	30	S	27	S	30	S	26	S	34	S	21	S	27	S	28	S	0	R	24	S	26	S	18	S	26	S	23	S	23	S	19	I
Escherichia coli	**G23A**	16	I	32	S	25	S	29	S	25	S	30	S	20	S	28	S	25	S	27	S	27	S	19	S	30	S	-		17	S	26	S	27	S	24	S	21	S
Escherichia coli	**G28A**	16	I	24	I	25	S	14	R	20	I	30	S	26	S	15	R	24	S	28	S	24	S	22	S	30	S	30	S	23	S	13	R	21	S	20	S	24	S
Escherichia coli	**G291**	24	S	25	I	22	S	23	S	24	S	20	I	15	I	38	S	20	S	20	S	18	S	12	R	23	S	21	S	22	S	24	S	13	I	20	S	30	S
Escherichia coli	**G46A1**	24	S	28	S	22	S	25	S	22	S	13	R	24	S	27	S	15	R	17	S	17	S	14	I	16	R	15	R	13	I	16	I	10	R	15	I	18	I
klebsiella oxytoca	**G46B**	24	S	27	S	22	S	26	S	22	S	16	I	22	S	27	S	16	I	18	S	17	S	12	R	16	R	14	R	16	S	22	S	14	I	15	I	17	R
Escherichia coli	**G46C**	22	S	18	R	18	I	12	R	16	R	0	R	24	S	18	R	0	R	16	I	0	R	0	R	15	R	-		27	S	18	S	9	R	23	S	30	S
Klebsiella ozaenae	**G46E**	12	R	17	R	18	I	18	I	20	I	30	S	0	R	15	R	18	I	26	S	32	S	12	R	24	S	23	S	20	S	0	R	18	S	17	I	21	S
Pseudomonas aeruginosa	**G46F**	1	R	18	R	20	I	15	R	27	S	32	S	13	I	17	R	18	I	25	S	31	S	12	R	24	S	20	S	26	S	1	R	22	S	16	I	33	S
Shigella sonnei	**G46G**	15	I	14	R	25	S	13	R	20	I	30	S	26	S	16	R	25	S	30	S	25	S	23	S	33	S	32	S	24	S	15	I	20	S	24	S	26	S

Continuação do APÊNDICE B: Perfil de resistência a partir da técnica de disco – difusão de isolados adquiridos de amostras de fezes e saliva de cães, coletadas em 2012.

Espécie	AMOSTRA	AMC		CTX		CTF		ATM		CAZ		CIP		SUT		ETP		PEF		LVX		NOR		NAL		ENO		MXF		GEN		CFO		OFX		TIG		AMI	
Pseudomonas aeruginosa	**C2B**	0	R	21	R	14	R	21	S	24	S	28	S	12	I	14	R	17	I	23	S	26	S	0	R	20	I	21	S	26	S	0	R	21	S	9	R	21	S
Escherichia coli	**C6B**	8	R	17	R	15	R	17	R	15	R	19	I	0	R	24	S	13	R	18	S	20	S	17	I	20	I	17	R	15	S	8	R	18	S	19	S	14	R
Escherichia coli	**C8**	18	S	10	R	9	R	14	R	15	R	0	R	0	R	24	S	0	R	7	R	0	R	0	R	0	R	0	R	7	R	21	S	6	R	20	S	14	R
Providencia alcalifaciens	**C10A**	20	S	28	S	25	S	30	S	22	S	27	S	27	S	24	S	20	S	23	S	25	S	21	S	21	I	18	I	15	S	19	S	20	S	19	S	17	R
Escherichia coli	**C10B**	18	S	12	R	9	R	15	R	17	R	0	R	0	R	26	S	0	R	10	R	0	R	0	R	0	R	0	R	10	R	20	S	0	R	19	S	14	R
Escherichia coli	**C13A**	21	S	26	S	23	S	26	S	24	S	19	I	0	R	28	S	15	R	18	S	20	S	14	I	18	I	17	R	19	S	12	R	18	S	17	I	15	R
Klebisiella pneumoniae	**C14A**	22	S	25	I	21	S	24	S	22	S	22	S	17	S	23	S	17	I	18	S	20	S	16	I	23	S	19	S	13	I	16	I	13	I	16	I	13	R
Escherichia coli	**C16-2**	7	R	17	R	15	R	14	R	13	R	25	S	24	S	22	I	22	S	27	S	23	S	19	S	26	S	23	S	13	I	11	R	20	S	16	I	13	R
Providencia spp.	**C16-3**	20	S	30	S	25	S	30	S	26	S	30	S	25	S	25	S	23	S	21	S	26	S	24	S	23	S	20	S	13	I	17	I	14	I	16	I	13	R
Escherichia coli	**C16-4**	9	R	20	R	17	R	18	I	15	R	27	S	29	S	27	S	24	S	24	S	25	S	20	S	26	S	23	S	14	I	12	R	17	S	20	S	12	R
Yokenella regensburgei	**C17A**	16	I	24	I	21	S	24	S	22	S	23	S	23	S	26	S	22	S	21	S	23	S	18	I	24	S	17	R	14	I	10	R	18	S	19	S	15	R
Burkhoderia spp.	**C19A1**	21	S	31	S	27	S	29	S	24	S	20	I	0	R	23	S	0	R	17	S	13	I	0	R	10	R	13	R	15	S	13	R	15	I	18	I	15	R
Escherichia coli	**C19A2**	22	S	28	S	24	S	27	S	24	S	23	S	0	R	28	S	23	S	21	S	23	S	19	S	23	S	17	R	9	R	24	S	19	S	20	S	16	R
Escherichia coli	**C19C**	17	I	11	R	8	R	16	R	22	S	24	S	0	R	28	S	16	I	23	S	24	S	0	R	23	S	24	S	11	R	23	S	22	S	24	S	18	I
E. fergusoni (50%)	**C20A**	25	S	29	S	25	S	28	S	27	S	23	S	0	R	29	S	18	I	22	S	24	S	18	I	24	S	19	S	10	R	24	S	23	S	21	S	17	R
Escherichia coli	**C20B**	20	S	30	S	25	S	30	S	26	S	35	S	0	R	30	S	25	S	34	S	35	S	20	S	28	S	25	S	15	S	25	S	30	S	17	I	15	R
Escherichia coli	**C21A**	21	S	28	S	24	S	27	S	25	S	28	S	23	S	30	S	29	S	25	S	30	S	21	S	30	S	26	S	14	I	24	S	22	S	19	S	15	R
Escherichia coli	**C23C**	20	S	29	S	23	S	28	S	25	S	25	S	24	S	30	S	28	S	31	S	31	S	23	S	30	S	22	S	14	I	23	S	20	S	18	I	15	R
Escherichia coli	**C33C1**	10	R	13	R	11	R	18	I	16	R	25	S	0	R	25	S	14	R	22	S	26	S	9	R	19	I	20	S	12	R	9	R	21	S	19	S	17	R
Escherichia coli	**C35A**	0	R	20	R	18	I	20	I	17	R	24	S	0	R	27	S	19	S	22	S	21	S	12	R	17	I	18	I	20	S	10	R	23	S	22	S	22	S
Shigella sonnei	**C49B**	0	R	22	R	18	I	30	S	30	S	36	S	8	R	24	S	30	S	32	S	36	S	18	I	35	S	32	S	16	S	0	R	35	S	12	R	18	I
Pseudomonas aeruginosa	**C51C**	0	R	13	R	9	R	19	I	27	S	33	S	0	R	15	R	13	R	21	S	30	S	0	R	16	R	17	R	22	S	0	R	17	S	12	R	27	S
Escherichia coli	**C52-4**	15	I	30	S	25	S	30	S	27	S	0	R	0	R	30	S	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	16	S	25	S	10	R	21	S	20	I
Escherichia coli	**C57A1**	22	S	30	S	24	S	27	S	25	S	24	S	25	S	34	S	26	S	30	S	24	S	18	I	30	S	25	S	17	S	25	S	24	S	19	S	22	S
Escherichia coli	**C64**	25	S	34	S	29	S	32	S	30	S	35	S	30	S	32	S	30	S	33	S	30	S	25	S	32	S	30	S	20	S	25	S	35	S	24	S	18	I
Escherichia coli	**C68A1**	12	R	14	R	12	R	18	I	22	S	14	R	0	R	28	S	0	R	12	R	12	R	0	R	12	R	12	R	22	S	24	S	12	R	22	S	20	I
Escherichia coli	**C69**	18	S	0	R	0	R	0	R	0	R	24	S	0	R	45	S	12	R	23	S	18	S	12	R	24	S	18	I	24	S	0	R	23	S	30	S	23	S
Pseudomonas aeruginosa	**39AN**	23	S	26	S	24	S	22	S	24	S	21	S	18	S	29	S	16	I	20	S	20	S	0	R	19	I	17	R	15	S	22	S	18	S	-	S	17	R
Escherichia coli	**41AC2**	0	R	0	R	0	R	13	R	15	R	18	I	0	R	23	S	18	I	17	S	20	S	16	I	19	I	14	R	10	R	12	R	18	S	-		19	I
Escherichia coli	**41AN22**	0	R	10	R	10	R	14	R	17	R	16	I	0	R	23	S	17	I	19	S	20	S	14	I	19	I	16	R	8	R	0	R	18	S	-		16	R
Escherichia coli	**42AC**	18	S	26	S	25	S	26	S	25	S	24	S	14	I	30	S	16	I	22	S	24	S	0	R	20	I	18	I	18	S	24	S	20	S	-		17	R
Pseudomonas aeruginosa	**49BN1**	0	R	20	R	18	I	24	S	25	S	35	S	7	R	25	S	20	S	26	S	30	S	9	R	20	I	19	S	18	S	0	R	24	S	12	R	22	S
Escherichia coli	**56AN1**	18	S	30	S	24	S	30	S	25	S	0	R	0	R	30	S	0	R	12	R	0	R	0	R	0	R	8	R	12	R	22	S	8	R	20	S		R

S: Sensível, I: Intermediário, R: Resistente.

APÊNDICE C: Termo de consentimento para a utilização de animais, exigido pelo CEUA-ICB assinados pelos responsáveis aos animais submetidos às coletas no ano de 2012.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: **Prevalência e identificação de determinantes de resistência às quinolonas/fluoroquinolonas *Qnr, Qep*, e *AAC(6')-1b-cr* mediados por plasmídeos em membros da família *Enterobacteriaceae* isolados de animais de companhia.**

Seus animais reúnem as características necessárias para participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa na qual seus animais ESTARÃO ENVOLVIDOS. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento deverá ser assinado, e só então daremos início ao estudo. A PARTICIPAÇÃO DE SEUS ANIMAIS neste estudo será de grande importância para nós, mas se quiser desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você nem aos seus animais.

Eu, GISELE R. MACEDO GUERRA....., portador da Cédula de identidade, RG 8.634.968-9, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meus animais da espécie *Felis catus*, sem raça indefinida, machos e fêmeas, nascidos entre ___/___ e ___/___ , cujos nomes estão relacionados na tabela anexa, participem do estudo "Prevalência e identificação de determinantes de resistência às quinolonas/fluoroquinolonas *Qnr, Qep*, e *AAC(6')-1b-cr* mediados por plasmídeos em membros da família *Enterobacteriaceae* isolados de animais de companhia". Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como os devidos esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

I) O estudo está sendo proposto para que se possa ampliar nosso conhecimento sobre a o problema de saúde pública e animal denominado "Infecção de bactérias resistentes";

II) Serão feitas coletas de material biológico (fezes) do reto por uma vez.

III) Essa (s) coleta(s) serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciará (influenciarão) no tratamento dos meus animais; nenhum dos procedimentos causará qualquer tipo de dano à saúde de meus animais, e todos os procedimentos serão realizados sob supervisão de um médico veterinário;

IV) A participação neste projeto não tem fins terapêuticos, nem terá custo algum para mim;

APÊNDICE D: Termo de consentimento para a utilização de animais, exigido pelo CEUA-ICB assinados pelos responsáveis aos animais submetidos às coletas no ano de 2012.

V) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

VI) A desistência não causará nenhum prejuízo à mim nem a meus animais, nem interferirá no atendimento ou tratamento médicos a que eles estiverem sendo submetidos;

VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem meu nome, nem os de meus animais, sejam mencionados;

VIII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final do estudo;

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

IX) Concordo que o material poderá ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa.

( ) Sim ou ( ) Não

São Paulo, 10 de Maio de 2012

.....

Proprietário responsável pelo animal

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone 27.052.108-9 f: 8426-7988

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone 28364578-7 / 8354-0306

Responsáveis pelo Projeto:

Luana Claudino de Melo — Aluno Pesquisador

Prof. Dr. Nilton H. Lincopan — Orientador

Telefone para contato:

Da equipe pesquisadora: (11) 3091-7296

Da CEUA: (11) 3091 7733

APÊNDICE E: Termo de consentimento para a utilização de animais, exigido pelo CEUA-ICB assinados pelos responsáveis aos animais submetidos às coletas no ano de 2012.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: **Prevalência e identificação de determinantes de resistência às quinolonas/fluoroquinolonas *Qnr, Qep*, e *AAC(6')-1b-cr* mediados por plasmídeos em membros da família *Enterobacteriaceae* isolados de animais de companhia.**

Seus animais reúnem as características necessárias para participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa na qual seus animais ESTARÃO ENVOLVIDOS. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento deverá ser assinado, e só então daremos início ao estudo. A PARTICIPAÇÃO DE SEUS ANIMAIS neste estudo será de grande importância para nós, mas se quiser desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você nem aos seus animais.

Eu, FERNANDO Y. M. HOSOMI, portador da Cédula de identidade, RG 33894434-S, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meus animais da espécie *Canis lupus familiaris,* sem raça indefinida, machos e fêmeas, nascidos entre 01/92 e 07/12, cujos nomes estão relacionados na tabela anexa, participem do estudo "Prevalência e identificação de determinantes de resistência às quinolonas/fluoroquinolonas *Qnr, Qep*, e *AAC(6')-1b-cr* mediados por plasmídeos em membros da família *Enterobacteriaceae* isolados de animais de companhia". Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como os devidos esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

I) O estudo está sendo proposto para que se possa ampliar nosso conhecimento sobre a o problema de saúde pública e animal denominado "Infecção de bactérias resistentes";

II) Serão feitas coletas de material biológico (fezes) do reto por uma vez.

III) Essa (s) coleta(s) serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciará (influenciarão) no tratamento dos meus animais; nenhum dos procedimentos causará qualquer tipo de dano à saúde de meus animais, e todos os procedimentos serão realizados sob supervisão de um médico veterinário;

IV) A participação neste projeto não tem fins terapêuticos, nem terá custo algum para mim;

APÊNDICE F – Termo de consentimento para a utilização de animais, exigido pelo CEUA-ICB assinados pelos responsáveis aos animais submetidos às coletas no ano de 2012.

V) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

VI) A desistência não causará nenhum prejuízo à mim nem a meus animais, nem interferirá no atendimento ou tratamento médicos a que eles estiverem sendo submetidos;

VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem meu nome, nem os de meus animais, sejam mencionados;

VIII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final do estudo;

(X) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

IX) Concordo que o material poderá ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa.

(X) Sim ou ( ) Não

São Paulo, 10 de Maio de 2012

Fernando Hosomi
Médico Veterinário
RF 784048-7
CRMV 22022

.....

Proprietário responsável pelo animal

Dra. Talma Rocha Tavares
Médica Veterinária
CRMV-SP

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone Talma Rocha 17424276 7/ 33778960

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone RG 36904.5/33778909

Responsáveis pelo Projeto:

Luana Claudino de Melo — Aluno Pesquisador

Prof. Dr. Nilton H. Lincopan — Orientador

Telefone para contato:

Da equipe pesquisadora: (11) 3091-7296

Da CEUA: (11) 3091 7733