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

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.

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).

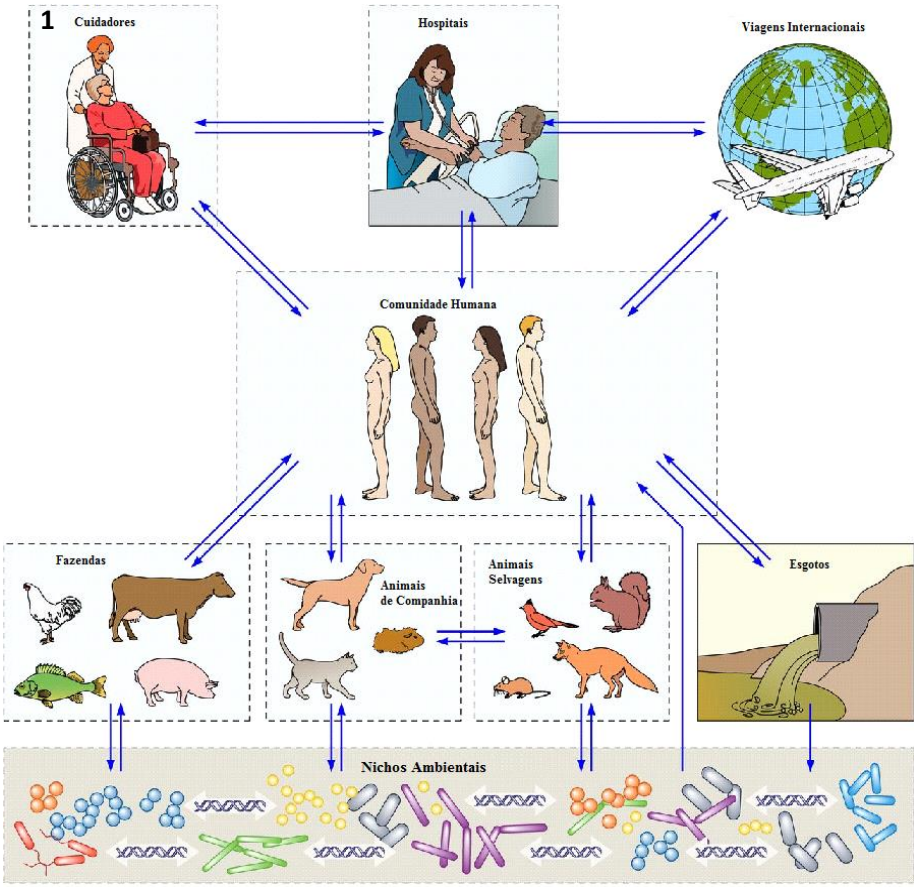

Figura 1 Representação dos principais reservatórios (digestivos e ambientais) de bactérias produtoras de enzimas β-lactamases, as quais os humanos e animais estão expostos e suscetíveis a uma transmissão cruzada. As setas mostram as transições de cepas ESBL entre os reservatórios, permitindo a troca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

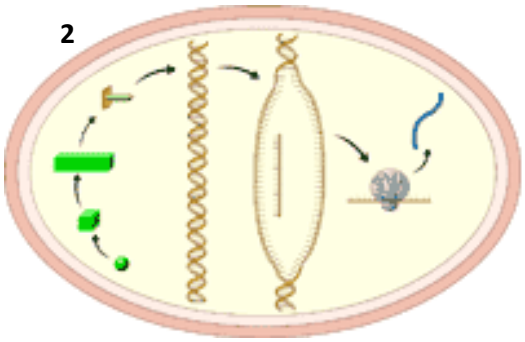

Figura 2. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias (Fonte: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude).

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).

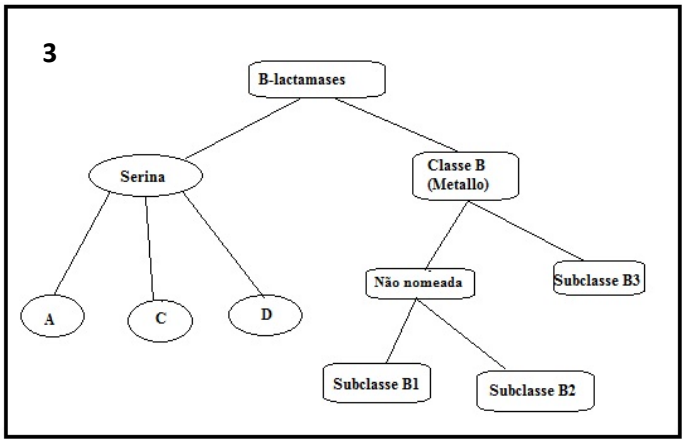

Figura 3. Diagrama esquemático da classificação de Ambler (adaptado de HALL et al., 2005).

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

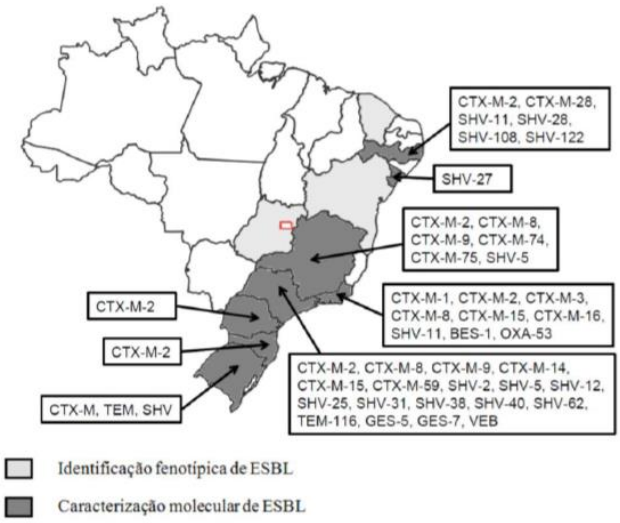

Figura 4. Panorama atual da resistência aos β-lactâmicos mediada por plasmídeos, no Brasil (Fonte: LINCOPAN, 2010).

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

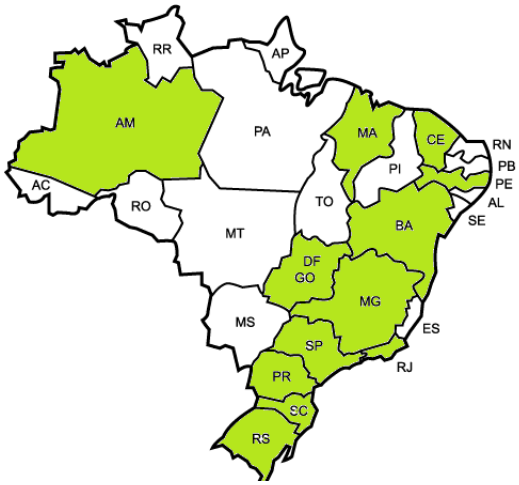

Figura 5. Panorama atual da resistência às Q/FQ mediada por plasmídeos, no Brasil (Fonte: LINCOPAN, 2012).

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 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 $bla_{\text{CTX-M-24}}$ 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.