ANA BEATRIZ CONTARELLI MEZEI

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS
DE AMOSTRAS DE *Escherichia coli*
ENTEROPATOGENICA ATÍPICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Marcia Regina Franzolin

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2017

RESUMO

MEZEI, A. B. C. **Perfil de resistência a antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* Enteropatogênica atípica.** 2017. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A *Escherichia coli* enteropatogênica atípica (aEPEC) é um dos principais agentes causadores de diarreia aguda infantil tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O tratamento da infecção geralmente inclui apenas a reposição de líquidos e eletrólitos, mas em casos mais graves pode ser necessário o tratamento com antimicrobianos. Entretanto, o uso indiscriminado pode induzir o aumento da incidência de bactérias resistentes a estes antimicrobianos. Um dos principais mecanismos de resistência é a produção da enzima β -lactamase de espectro estendido (*Extended-Spectrum β -lactamase* - ESBL), capaz de degradar antibióticos β -lactâmicos. O objetivo do presente trabalho foi verificar o perfil de resistência aos antimicrobianos de 72 amostras de aEPEC isoladas de um estudo epidemiológico sobre a diarreia aguda infantil em Salvador (BA), correlacionando com o perfil genético de amostras resistentes em relação a genes de resistência, juntamente com a produção de ESBL. O perfil de resistência das amostras frente aos antimicrobianos e a detecção inicial da produção de ESBL foram obtidos através do método de difusão de disco de Kirby-Bauer, em ágar Mueller Hinton, com antimicrobianos pertencentes às classes β -lactâmicos, Fosfomicina, Aminoglicosídeo, Quinolona, Ansamicina, Sulfonamidas e Tetraciclina. A pesquisa dos seguintes genes de resistência foi realizada através de reação em cadeia da polimerase (PCR): *sul1* e *sul2* (sulfonamidas), *tetA*, *tetB* e *tetC* (tetraciclina), *bla_{CTX-M}*, *bla_{CTX-M-8}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM-1}* (β -lactâmicos) e *int11* (Integron de classe I). As aEPEC apresentaram resistência apenas aos β -lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclina, aminoglicosídeos e ansamicina. Entre os isolados bacterianos analisados, 20 (27,8%) apresentaram multirresistência. A identificação inicial da produção de ESBLs foi realizada através do teste de disco aproximação, o qual detectou 23 amostras (31,9%) com esse fenótipo, sendo confirmadas 13 amostras bacterianas (18,1%) como produtoras de ESBL após realizar o teste de microdiluição em ágar. O gene *sul1* foi encontrado em 11 amostras (50%), *sul2* em 19 (86,4%), *tetA* em 8 (42,1%), *tetB* em 12 (68,4%), e *tetC* em 1 amostra (5,3%). Dentre os genes de resistência às β -lactamases, *bla_{CTX-M}* foi encontrado em 6 amostras (26,1%), *bla_{TEM-1}* em 18 (78,3%) e *bla_{SHV}* em 1 amostra (4,4%). Os genes *bla_{CTX-M-8}* e *bla_{CTX-M-15}* não foram detectados. O gene *int11* foi encontrado em 15 amostras (35,7%). O conhecimento sobre o perfil de resistência e produção de ESBLs é muito importante na orientação do tratamento adequado quando se fizer necessário, para poder evitar desperdícios e trocas frequentes de antimicrobianos, além de conhecer o potencial de genes e de mecanismos de resistência que poderiam vir a ser transferidos para outras bactérias.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Diarreia. EPEC atípica. Resistência antimicrobiana. β -lactamases de espectro estendido (ESBL).

ABSTRACT

MEZEI, A. B. C. **Antimicrobial resistance profile of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains.** 2017. 111 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) is one of the most common childhood diarrhea's agent in developed and developing countries. The treatment includes only the fluid replacement and electrolytes, but in more severe cases, the treatment with antimicrobials may be necessary. However, the indiscriminate use can induce the increase of resistant bacteria incidence. One of the main resistance mechanisms is the extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) production, responsible for the degradation of β -lactam antimicrobials. The aim of this study was verify the antimicrobial resistance profile of 72 aEPEC strains isolated in an epidemiologic study about acute infantile diarrhea in Salvador (BA), correlating with the genetic profile of these strains in relation to resistance genes, together with ESBL production. The resistance profile of the strains against the antimicrobials and the screening of ESBL were obtained by the Kirby-Bauer disc diffusion method in Mueller Hinton agar with antimicrobials belonging to the classes: β -lactam, Fosfomicin, Aminoglycoside, Quinolone, Ansamycin, Sulfonamides and Tetracycline. The following resistance genes were investigated through the polymerase chain reaction (PCR): *sul1* and *sul2* (sulfonamides), *tetA*, *tetB* and *tetC* (tetracyclines), *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM-1} (β -lactam) and *int11* (class I Integron). The aEPEC strains showed resistance only to β -lactams, Sulfonamides, Tetracyclines, Aminoglycosides and Ansamycin. Among the bacterial isolates analyzed, 20 (27.8%) presented multiresistance. The initial identification of the ESBLs was performed through the disc-approximation test, which detected 23 strains (31.9%) with this phenotype, being confirmed only 13 bacterial strains (18.1%) as ESBL producers after the test of microdilution in agar. The *sul1* gene was found in 11 strains (50%), *sul2* in 19 (86.4%), *tetA* in 8 (42.1%), *tetB* in 12 (68.4%), and *tetC* in 1 strain (5.3%). Among the β -lactamases resistance genes, *bla*_{CTX-M} was found in 6 strains (26.1%), *bla*_{TEM-1} was found in 18 (78.3%), and *bla*_{SHV} was found in 1 strain (4.4%). The *bla*_{CTX-M-8} and *bla*_{CTX-M-15} genes were not detected. The *Int11* gene was found in 15 strains (35.7%). The knowledge about resistance profile's and ESBL production is very important in guiding the most appropriate treatment when it is necessary, avoiding wastes and frequent exchanges of antimicrobials, in addition to knowing the genes and mechanisms of resistance potential that could be transferred to other bacteria.

Keywords: *Escherichia coli*. Diarrhea. Atypical EPEC. Antimicrobial resistance. Extended Spectrum- β -lactamases (ESBL).

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diarreia infecciosa

A diarreia infecciosa, também conhecida como gastroenterite, é uma síndrome causada por diferentes agentes etiológicos, incluindo bactérias como *Vibrio cholerae*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni* e *Escherichia coli* (CASBURN-JONES; FARTHING, 2016; CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2012).

A doença é transmitida via fecal-oral, através do contato com água ou alimentos contaminados por fezes, principalmente pelo contato com esgoto não tratado. Estima-se mundialmente que cerca de 780 milhões de pessoas não têm acesso a água potável e 2,5 bilhões de pessoas não têm acesso a saneamento básico (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015), o que contribui em muito para a incidência de diarreia. A contaminação também pode ocorrer através do contato pessoal ou preparo de alimentos em condições inadequadas de higiene (WARDLAW et al., 2010).

A gastroenterite é definida com o aparecimento de três ou mais evacuações ao dia com fezes pastosas ou líquidas. A doença é auto-limitada, com duração entre 2 a 14 dias (CVE, 2008). O sintoma mais grave da doença é a desidratação, pois durante o estabelecimento da doença água e eletrólitos (como sódio, cloreto, potássio e bicarbonato) são perdidos nas evacuações e vômito. Um quadro de desidratação moderada causa no paciente inquietação, diminuição da elasticidade na pele e olhos “fundos”. Em casos mais graves, os sintomas da desidratação moderada se intensificam e o indivíduo pode entrar em choque e ir a óbito. Existem três tipos de diarreia: diarreia aguda (com duração entre 5 a 10 dias), disenteria: diarreia aguda sanguinolenta e diarreia persistente: com duração de 14 dias ou mais (CASBURN-JONES; FARTHING, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

A diarreia é a segunda maior causa de morte em crianças menores do que cinco anos de idade em países em desenvolvimento, ficando atrás apenas da pneumonia. As duas doenças são responsáveis por cerca de 40% das mortes de crianças no mundo anualmente (DIAS et al., 2016; QU et al., 2016; WARDLAW, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015), ocorrem cerca de 1,7 bilhões de casos de diarreia anualmente, com morte de aproximadamente 760.000 crianças no período. A média de incidentes de diarreia é de 2-3 episódios por criança por ano (QU et al., 2016).

O tratamento da doença inclui hidratação do paciente, com reposição da água e eletrólitos perdidos. Em casos mais brandos, a hidratação pode ser realizada oralmente, com a utilização de soros caseiros e soluções isotônicas. Porém em casos de desidratação mais intensa, deve ser realizada intravenosamente (WARDLAW et al., 2010). A terapia antimicrobiana não é recomendada para casos de diarreia aguda (MARCOS et al., 2007). Entretanto, quando apenas a reidratação não é o suficiente, o uso de antimicrobianos pode ser necessário. Como em casos de disenteria causada por *Shigella spp.*, cólera; em casos em que há prejuízo do sistema imunológico (pacientes imunossuprimidos, crianças muito pequenas e idosos), nos casos de diarreia persistente (como as causadas por *Escherichia coli*) e de pacientes reincidentes (CASBURN-JONES; FARTHING, 2004; CLEARY, 2004; DIAS et al., 2016; OCHOA; SALAZAR-LINDO).

1.2 *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli*, pertencente à família Enterobacteriaceae, é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, com variantes imóveis e móveis (com flagelos peritríquios). É uma das bactérias mais comuns que habitam o trato intestinal (CROXEN et al., 2013). As amostras de *Escherichia coli* podem ser divididas em dois grandes grupos: comensal e patogênica. O primeiro é constituído por amostras pertencentes à microbiota intestinal natural de humanos e de alguns animais saudáveis. O segundo, por patogênicas, com mecanismos de virulência e patogenicidade específicos, sendo capazes de causar sérias infecções e doenças. Essas infecções podem ser extra-intestinais e intestinais, sendo que o indivíduo pode desencadear síndromes clínicas como infecção do trato urinário, meningite do recém-nascido e sepse; e infecções entéricas, sendo nessa situação as bactérias denominadas de *Escherichia coli* diarreio gênicas (DEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As DEC são atualmente classificadas em 6 categorias ou patótipos, considerando-se seus mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os sorotipos O:H, os aspectos epidemiológicos ou os tipos de interação com linhagens celulares. Essas categorias de DEC são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga/ *E. coli* Enterohemorrágica (STEC/EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), e *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC) (GOMES et al., 2016; NATARO; KAPER, 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; PIAZZA et al., 2009).

1.3 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Existem dois tipos de EPEC. A EPEC típica (tEPEC) possui um plasmídeo denominado EAF (*EPEC adherence factor*), que codifica para a fímbria BFP (*bundle-forming pilus*) e em 1995 foi criado o termo EPEC atípica (aEPEC), para denominar as EPEC que não possuem o plasmídeo EAF (GOMES et al., 2016; NATARO; KAPER, 1998; KAPER, 1996; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Segundo Trabulsi, Keller e Gomes (2002), as amostras que além do gene *eae* possuem o gene *bfpA*, mas desde que não expressem o *bundle forming pilus* (BFP), seriam consideradas EPEC atípicas.

Outra diferença é o padrão de aderência entre a bactéria e a célula hospedeira. A tEPEC forma microcolônias compactas aderidas na superfície das linhagens celulares (HEp-2/HeLa) cultivadas *in vitro*, em um padrão conhecido como aderência localizada (AL), sendo visualizadas após três horas de incubação da bactéria com célula (SCALETSKY et al., 1984). A aEPEC apresenta na maioria das cepas um padrão conhecido como aderência localizada-like (ALL), semelhante à AL, porém com microcolônias mais “frouxas”, sendo visualizadas após seis horas de contato bactéria-célula (GOMES et al., 2004). Outros padrões de adesão possíveis para aEPEC são: adesão localizada (AL), adesão difusa (AD), adesão agregativa (AA), padrão indeterminado, ou mesmo não aderente às células epiteliais *in vitro* (ABE et al., 2009; CROXEN et al., 2013; DIAS et al., 2016; HERNANDES et al., 2009; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Os sorotipos de aEPEC podem pertencer ou não aos chamados sorogrupos O de EPEC, diferindo dos sorotipos de tEPEC basicamente pelos antígenos H, frequentemente apresentando o mesmo antígeno O (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004). Os sorotipos clássicos de tEPEC são: O86:H34, O114:H2, O127:H6, O127:H40, O142:H6, O142:H34. Enquanto os de aEPEC são: O26:H11, O26:H⁻, O55:H7, O55:H⁻, O55:H34, O86:H8, O111:H9, O111:H25, O111:H⁻, O119:H2, O125ac:H6 e O128:H2 (CROXEN et al., 2013; HERNANDES et al., 2009).

1.3.1 Mecanismo de patogenicidade

As amostras de EPEC não produzem as toxinas de Shiga e colonizam o intestino delgado onde causam uma histopatologia característica conhecida como *attaching and effacing* (lesão A/E) nas células epiteliais do intestino (enterócito) (Figura 1). Essa lesão é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais, aderência íntima da bactéria à célula epitelial e reorganização do citoesqueleto, levando à formação de um pedestal onde a bactéria permanece intimamente aderida (CROXEN et al., 2013; MOON et al., 1983; OCHOA; SALAZAR-LINDO; CLEARY, 2004).

Figura 1. Microscopia eletrônica de transmissão mostrando lesão intestinal A/E de EPEC.

Fonte: WONG et al. (2011).

Os genes necessários para a produção da lesão A/E encontram-se na ilha de patogenicidade denominada região LEE (*locus of enterocyte effacement*) de 35 Kb (Figura 2). Esta região encontra-se organizada em cinco operons designados: LEE1, LEE2, LEE3, LEE5 e LEE4 (DEAN; MARESCA; KENNY, 2005). Os operons LEE1, LEE2 e LEE3 contêm os genes *esc* e *sep* que codificam os componentes necessários do sistema de secreção do tipo 3 (T3SS) e o gene regulador *ler*, que codifica a proteína Ler (*LEE encoded regulator*), a qual regula positivamente os genes dentro e fora de LEE (ELLIOTT et al., 2000). LEE5 codifica a intimina, seu receptor translocado – Tir (*Translocated intimin receptor*) e a chaperonina CesT das proteínas Tir e Map (SÁNCHEZ-SANMARTÍN et al., 2001). A intimina é uma proteína de membrana externa de 94 kDa codificada pelo gene *eae* (presente no operon LEE5). LEE4

codifica as proteínas secretadas pelo T3SS (*EPEC secreted proteins*: SepL, EspA, EspD, EspB, EscF, EspF e CesD2) que são componentes do aparato de translocação pelo qual outras proteínas efetoras são translocadas para dentro do enterócito (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Figura 2. Diagrama ilustrando a organização genética da região LEE de EPEC E2348/69.

Fonte: Modificado de WONG et al. (2011).

Enquanto a ligação inicial da tEPEC à superfície do enterócito é mediada pela fímbria BFP, a aEPEC possui outros meios para se ligar à célula intestinal. Algumas possuem uma proteína de membrana denominada fator inibidor de linfócito (LifA). Embora seja mais comum em tEPEC, amostras de aEPEC contendo esta proteína já foram encontradas em casos de diarreia infantil. Outro fator de adesão que aEPEC poderia utilizar é a proteína secretada EspA, que também pode desempenhar papel de mediador entre a bactéria e a célula hospedeira. Nos dois casos, a ligação ocorre de uma forma mais “frouxa” do que ocorre com a fímbria BFP (CROXEN et al., 2013).

O passo seguinte é a secreção de Tir através do T3SS e sua ligação com a intimina. O T3SS é uma estrutura de forma cilíndrica e encontra-se associado com as duas membranas da bactéria Gram-negativa, existindo uma estrutura em forma de anel em cada membrana, dando estabilidade ao complexo. Uma estrutura extracelular oca, chamada translocon se estende para fora da parede celular bacteriana e que pode ser inserido em membranas eucarióticas. Energia derivada da hidrólise de ATP conduz a translocação de proteínas bacterianas (efetores) do citoplasma bacteriano para o citoplasma da célula eucariótica, onde pode controlar os sistemas de sinalização da célula hospedeira (COSSART, 2006; DEAN; MARESCA; KENNY, 2005; PIZARRO-CERDÁ). O canal transmembrânico que liga a bactéria à célula ocorre devido a extensão de proteína EspA, por onde irão passar as proteínas EspB e EspD, que são

responsáveis pela formação do poro na membrana da célula epitelial (HARTLAND et al., 2000).

EPEC injeta via T3SS a proteína Tir, que se integra na membrana plasmática da célula hospedeira e funciona como receptor para intimina. A interação de Tir com a Intimina promove uma cascata de sinalização que atua no recrutamento de proteínas do citoplasma da célula hospedeira abaixo do local de aderência da bactéria. Ocorre a polimerização de actina, que se liga a proteínas como a α -actina, talina e vinculina, levando a uma reestruturação da célula hospedeira com supressão das microvilosidades e formação de uma estrutura em forma de pedestal em que a bactéria se encontra aderida ao enterócito (OCHOA; CONTRERAS, 2011; PIZARRO-CERDÁ; COSSART, 2006)

Além de Tir, outras proteínas efetoras são injetadas através do T3SS dentro da célula hospedeira. São elas: Map, EspF, EspG, EspZ e EspH, cada uma com funções específicas. Map (*Mitochondrial-associated protein*) estimula a formação de filopódios membranosos e rompem as barreiras epiteliais, assim como leva a disfunções mitocondriais. EspF e EspG afetam a localização da aquaporina (canais de absorção de água), levando a diarreia. EspG altera componentes do citoesqueleto da célula hospedeira, interagindo com a tubulina. EspZ promove a sobrevivência da célula hospedeira, enquanto EspH afeta negativamente a formação dos filopódios, participando da sinalização da actina durante a formação do pedestal (CROXEN et al, 2013; OCHOA; CONTRERAS, 2011; WONG et al., 2011).

As amostras de aEPEC podem apresentar fatores de virulência codificados pela região LEE, assim como expressar outros fatores, tais como enterotoxinas, citotoxinas e adesinas responsáveis pela adesão difusa e agregativa, dependendo do sorotipo e por vezes dentro de um mesmo sorotipo entre as amostras que o constituem, apresentando grande heterogeneidade de características (ABE et al., 2009; GOMES; HERNANDES, 2015; HERNANDEZ et al., 2009; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

O papel da EPEC no acometimento da diarreia ainda não está bem estabelecido. Porém, a supressão das microvilosidades poderia levar à diminuição das superfícies absorptivas, deste modo contribuindo no estabelecimento da diarreia através da interferência na absorção de fluídos e interrupção do balanço eletrolítico nas células epiteliais do intestino (HU; TORRES, 2015).

1.3.2 Epidemiologia

Dos seis patótipos de DEC, estima-se que EPEC seja responsável por 5 a 10% dos episódios de diarreia pediátrica em países em desenvolvimento (CROXEN et al., 2013; HU; TORRES, 2016). A ocorrência de diarreia causada por EPEC diminui conforme a idade, sendo infecções em adultos raramente relatadas. Essa aparente “resistência” em adultos e crianças mais velhas tem sido atribuída a perda de receptores específicos de EPEC com a idade ou desenvolvimento da imunidade (CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016).

A aEPEC é um importante agente etiológico da diarreia aguda, acometendo principalmente crianças menores de cinco anos de idade. É capaz de causar tanto diarreia aguda como persistente (AFSET et al., 2004; FAGUNDES-NETO; MORA et al., 2016; SCALETISKY, 2000; NGUYEN et al., 2005; SCALETISKY et al., 1999; SCALETISKY, 2000; YATSUYANAGI et al., 2003).

Na década de 1990, tEPEC era considerada a principal causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento. Entretanto, atualmente aEPEC é considerada mais prevalente do que tEPEC tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, indicando as aEPEC como patógenos emergentes (BUERIS et al., 2007; DIAS et al., 2016; FRANZOLIN et al., 2005; MORENO et al., 2010; TRABULSI; KELLER; GOMES 2002). No Brasil, 92% das EPEC isoladas de crianças entre 2001 e 2002 foram de aEPEC, em comparação com 38% em 1998-1999 (GOMES et al., 2016).

Estudos realizados no Irã (BAKHSHI; FALLAHZAD; POURSHAFIE, 2013) Tailândia (RATCHTRACHENCHAI et al., 2004), Brasil (BUERIS et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2005; LOZER et al., 2013; MORENO et al., 2010), Noruega (AFSET; BERGH; BEVANGER, 2003), Austrália (NGUYEN et al., 2006), China (QU et al., 2016), entre outros apontam a prevalência de aEPEC, embora ainda existam estudos indicando tEPEC como o mais prevalente (ALIKHANI; MIRSALEHIAN; ASLANI, 2006).

Os fatores de risco para o desenvolvimento da diarreia persistente que pode ser ocasionada por aEPEC são a desnutrição, imunossupressão e tenra idade, além da ocorrência de outros episódios prévios de diarreia (OCHOA; SALAZAR-LINDO; CLEARY, 2004). As aEPEC podem também ser isoladas em pacientes adultos e em pacientes imunocomprometidos pelo HIV (GOMES et al., 2004).

1.3.3 Reservatórios

Enquanto o homem é o único reservatório natural de tEPEC, amostras de aEPEC tem sido isoladas de diversos animais (seja domésticos, como cães e gatos; os utilizados para alimentação, como o gado ou ainda os silvestres como o macaco). Algumas amostras de aEPEC isoladas de animais pertencem a sorogrupos envolvidos em doenças humanas (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; CARVALHO et al., 2003; KRAUSE et al., 2005; LEOMIL et al., 2005; MORATO et al., 2008; NAKAZATO et al., 2004), sugerindo que estes animais poderiam desempenhar papel de reservatório destes patógenos e fonte de transmissão para os humanos, embora nenhuma transmissão interespecífica tenha ocorrido entre animais e humanos (GOMES et al., 2016; HERNANDES et al., 2009; MOURA et al., 2009).

1.4 Antimicrobianos

Nos processos de crescimento e divisão, a célula bacteriana deve sintetizar ou adquirir do ambiente, moléculas essenciais. Agentes antimicrobianos interferem em processos específicos que são essenciais para o crescimento e/ou divisão da célula bacteriana (LIWA; JAKA, 2015). Os antimicrobianos com estrutura química semelhante apresentam mecanismos de ação similares, partilhando parcial ou totalmente os microrganismos sobre o qual atuam (ALTERTHUM, 2015).

Os antimicrobianos têm como objetivo eliminar a bactéria (bactericidas) ou inibir seu crescimento (bacteriostático) e se possível, preservando a microbiota natural do indivíduo, além de minimizar o efeito tóxico das drogas no homem. O mecanismo de ação das diferentes classes dos antimicrobianos pode ocorrer através de inibição na síntese da parede celular, alteração na síntese de ácidos nucleicos, inibição da síntese de proteínas, inibição na síntese de ácido fólico e alteração da permeabilidade da membrana celular (ALTERTHUM, 2015; CHEN et al., 2004; SOUSA-JUNIOR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004). Os principais mecanismos de ação de algumas classes de antimicrobianos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Mecanismo de ação de classes de antimicrobianos

Classes dos antimicrobianos	Alvo do antimicrobiano
β -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos	Interferência na síntese do peptideoglicano, através da inibição das proteínas ligadoras de penicilina (PBP), responsáveis pela fase final da síntese da parede bacteriana
Quinolonas: ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina,	Inibição da atividade da DNA girase ou topoisomerase II
Aminoglicosídeos: estreptomicina, gentamicina, ampicacina.	Ligação com a subunidade 30S dos ribossomos inibindo a síntese protéica ou produzindo proteínas com defeitos
Fenicol: Cloranfenicol	Ligação com a subunidade 50S do ribossomo, inibindo a síntese protéica
Sulfonamidas/Cotrimoxazol	Inibição do metabolismo do ácido fólico. A Trimetoprima tem efeito sinérgico com Sulfametoxazol, sendo denominados Cotrimoxazol
Tetraciclínas	Ligação com a subunidade 30S do ribossomo, inibindo a síntese protéica
Ansamicina: rifampicina	Inibição da RNA polimerase
Fosfomicina	Inibição de piruvil-transferase, enzima catalisadora da biossíntese do peptideoglicano

Fonte: ANVISA, 2016; LIWA; JAKA, 2015.

1.4.1 Resistência aos antimicrobianos

O uso indiscriminado e sem controle no tratamento de infecções induziram ao aumento da incidência de formas bacterianas resistentes a estes antimicrobianos. Com isso, o paciente pode ser levado à piora clínica, podendo até mesmo ser levado a óbito dependendo da gravidade da infecção (SANTOS, 2009).

Nosso laboratório realizou um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda em crianças menores de cinco anos de idade, na cidade de Salvador (BA), sendo aEPEC um dos patótipos mais identificado após EAEC (BUERIS et al., 2007). Foram realizados vários estudos em relação a essas amostras emergentes de aEPEC (ABE et al., 2009) e escolhemos aprofundar o estudo da resistência a antimicrobianos, incluindo novos antibióticos, a pesquisa de produção de β -lactamases de espectro estendido e pesquisa de alguns genes de resistência. Como aEPEC pode acometer pacientes imunodeprimidos ou com outras doenças e piorar bastante o quadro clínico, além de poder causar diarreia persistente, nessas situações pode ser indicado tratamento com antimicrobianos. Porém, o uso empírico e indiscriminado no uso de antimicrobianos em diversas patogenias levou a uma seleção de cepas bacterianas cada vez mais resistentes nas infecções humanas. Como consequência, serão necessários antimicrobianos cada vez mais fortes e com piores efeitos colaterais.

O aparecimento de formas bacterianas resistentes a drogas de uso comum tem grande importância na saúde pública, já que essas cepas contêm genes de resistência a múltiplas drogas os quais podem ser transportados por elementos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, possibilitando a disseminação desses genes pelos alimentos e pela água, permitindo que a bactéria sobreviva em uma ampla diversidade de habitats (ALTERTHUM, 2015).

Bactérias resistentes são capazes de crescer nas concentrações que os antimicrobianos atingem no sangue, quando administradas no tratamento de infecções. Uma bactéria pode se tornar resistente por diferentes mecanismos: produção de enzimas que modificam a molécula e inativam a molécula do antibacteriano, diminuição da permeabilidade da célula, alteração do sistema de transporte na célula, alteração do receptor com síntese de enzimas que não sofrem a ação antibacteriana, e retirada do antimicrobiano do meio intracelular através de bombas de efluxo. Bactérias contendo algum mecanismo de resistência são selecionadas através da utilização dos antimicrobianos no tratamento de infecções, com remoção das bactérias sensíveis e sobrevivência das resistentes (BUTAYE; CLOECKAERT;

SCHWARZ, 2003; CHEN et al., 2004; CONCEIÇÃO, 2004; SOUSA-JUNIOR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004; TENOVER, 2006).

A verificação do padrão de sensibilidade e resistência de bactérias frente a antimicrobianos é comumente pesquisada através de teste de difusão em disco ou antibiogramas (MARTINO, 2015). O resultado fornecido é apenas qualitativo, pois determina se o organismo é sensível, intermediário ou resistente à ação do medicamento, sendo o mais empregado na rotina laboratorial devido a sua fácil e rápida obtenção de resultados (OPLUSTIL et al., 2000).

Para verificar de forma quantitativa a sensibilidade aos antimicrobianos, emprega-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A CIM é a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir visivelmente o crescimento bacteriano, a qual pode ser realizada em meio sólido ou em meio líquido (através dos métodos de macrodiluição ou microdiluição). A CIM pode ser detectada a “olho nu” ou através de aparelhos baseados em leitura óptica (ANDREWS, 2001), ou até mesmo empregando corantes de viabilidade, como a resazurina, empregado para medir a atividade metabólica e proliferação de células vivas (RIBEIRO et al., 2004)..

As metodologias utilizadas para realizar cada um destes testes citados devem estar de acordo com as normas do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute* – antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - NCCLS) ou de outros comitês como o europeu (EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) e no Brasil o BrCAST (*Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, baseado no EUCAST) que vem implementando normas a serem empregadas nos laboratórios clínicos de acordo com a nossa realidade. O CLSI é uma organização americana sem fins lucrativos que reúne as diversas perspectivas e conhecimentos da comunidade científica mundial para promover a excelência em diagnóstico laboratorial. Esse comitê desenvolve manuais com padrões laboratoriais clínicos que auxiliam na eficiência e confiabilidade dos resultados (CLSI, 2014).

A resistência aos antimicrobianos pode ser natural ou adquirida. A resistência natural ou intrínseca é uma característica própria da espécie bacteriana e que ocorre naturalmente no cromossomo durante o processo evolutivo. A resistência adquirida ocorre quando há o aparecimento de resistência em uma bactéria anteriormente sensível ao antimicrobiano, enquanto que as células genitoras são sensíveis, sendo uma característica pertencente somente a algumas bactérias de uma espécie (ALEKSHUN; LEVY, 2007; ALTERTHUM, 2015).

A resistência adquirida ocorre através de transmissão horizontal, onde os genes de resistência são obtidos através de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, provenientes de outras células bacterianas, aumentando a aquisição e disseminação de genes de resistência entre bactérias da mesma espécie ou entre espécies diferentes (ALEKSHUN; LEVY, 2007; BUTAYE; CLOECKAERT; SCHWARZ, 2003; CHANG et al., 2011; TENOVER, 2006).

Plasmídeos são moléculas de DNA dupla fita circulares, com capacidade de se duplicar independente do DNA cromossômico. Codificam genes que não são essenciais para a sobrevivência da bactéria, mas que lhes confere vantagem, como genes de resistência a antimicrobianos. Essas moléculas podem ser transferidas entre bactérias na conjugação, transferência de material genético através da formação de fímbrias sexuais e contato direto célula-célula. Plasmídeos capazes de efetuar sua própria transferência para outras células são denominados plasmídeos conjugativos (ALEKSHUN; LEVY, 2007; CONCEIÇÃO, 2004; SOUSA-JUNIOR; FERREIRA).

Transposons são elementos móveis de DNA capazes de se movimentar dentro do genoma bacteriano, independente da homologia entre a região de origem e o local de inserção. Promovem o intercâmbio de material genético e, consequentemente, recombinação no DNA (PADILLA; COSTA, 2015). O deslocamento destes segmentos é possível devido à presença da enzima transposase, que é responsável por “cortar” as extremidades do fragmento móvel e pela sua transposição na molécula de DNA alvo. Transposons simples são denominados sequências de inserção (SI), em que está presente apenas o gene que codifica a transposase e sítios de reconhecimento. Estes sítios são constituídos de sequências genéticas curtas repetidas e invertidas reconhecidas pela enzima como local de recombinação entre os transposons e o genoma da bactéria. Porém, existem transposons mais complexos que transportam genes específicos, como genes de resistência a antimicrobianos. Plasmídeos podem auxiliar na transferência de transposons entre bactérias, entretanto existem transposons capazes de se transferir de uma célula à outra sem auxílio de outro carreador. São denominados transposons conjugativos. Transposons contendo genes de resistência à tetraciclina podem ter sido um dos primeiros a adquirir propriedades conjugativas, pois é um dos mais disseminados (MOREIRA et al., 2013; PADILLA; COSTA, 2015; PEIRANO et al., 2005).

Integrons são pequenos sistemas genéticos modulares móveis capazes de capturar, integrar e mobilizar elementos móveis denominados cassetes, podendo codificar genes de resistência aos antimicrobianos contidos ou genes de função desconhecidas. São formados por

dois segmentos de DNA conservados (5' e 3') separados por um segmento de comprimento e sequência variável, no qual estão inseridos cassetes móveis de genes. Os integrons são constituídos por três elementos necessários para captura e expressão dos genes: a integrase, uma recombinase sítio-específica responsável pela inserção dos genes contidos nos cassetes; um sítio de recombinação (*attI*); e uma região promotora, pois os cassetes não possuem os promotores necessários para sua expressão. Genes de resistência carregados por integrons estão presentes em bactérias Gram-negativas, principalmente Enterobactérias (ALEKSHUN; LEVY, 2007; CHEN et al., 2004; CHUANCHUEN; KOOWATANANUKUL; KHEMTONG, 2008).

A classificação dos integrons em classes é baseada nas diferenças das sequências dos genes que codificam a integrase. Atualmente existem 9 classes de integrons, sendo que apenas as classes 1, 2, 3 e 9 contêm genes de resistência a antimicrobianos e as demais classes possuem genes com funções desconhecidas. Os integrons de classe 1 são os mais encontrados em isolados clínicos e a maior parte dos cassetes de genes de resistência pertencem à esta classe. Podem ser carregados entre células bacterianas através de plasmídeos ou transposons conjugativos (CHEN et al., 2004; LÉVESQUE et al., 1995; PEIRANO et al., 2005; SAEED et al., 2009; SUNDE; NORSTRO, 2006).

A transmissão de genes de resistência (natural ou adquirida) também ocorre no processo de divisão celular, sendo denominada transmissão vertical (BUTAYE; CLOECKAERT; SCHWARZ, 2003; TENOVER, 2006).

Muitas espécies bacterianas acabam se tornando resistentes a várias classes de antimicrobianos, sendo denominadas bactérias multirresistentes. Este fenômeno ocorre pelo acúmulo de plasmídeos de resistência ou transposons pela bactéria, sendo que cada um deles codifica resistência a um agente específico e/ou codifica proteínas responsáveis pela expulsão de diferentes agentes antimicrobianos do meio intracelular bacteriano, através da chamada bomba de efluxo (NIKAIDO, 2009).

Estudos sobre o perfil de resistência bacteriano em amostras isoladas de pacientes são importantes porque permitem visualizar que tipo de cepa está circulando nas infecções dos pacientes, a que antimicrobianos são resistentes e orientando qual seria o melhor programa de tratamento. O perfil genético de resistência também é importante, pois permite verificar quais genes poderiam ser transferidos para outras bactérias e estudar os principais veículos de transferência.

O presente trabalho verificou a presença de genes de resistência a antimicrobianos β -lactâmicos, Tetraciclina e Sulfonamidas.

1.4.2 Resistência aos β -lactâmicos - β -lactamase de espectro estendido (ESBL)

Os antibióticos β -lactâmicos possuem amplo espectro e interferem na síntese da parede celular, bloqueando a etapa final de síntese de peptidoglicano. Este grupo de antimicrobianos possui um anel β -lactâmico, composto por três átomos de carbono e um de nitrogênio. Incluem-se as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos, e os carbapenêmicos (ALTERTHUM, 2015; SOUSA-JUNIOR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004).

Em bacilos Gram-negativos, existem três mecanismos de resistência aos β -lactâmicos: alteração do sítio de ligação (proteínas ligadoras de penicilinas ou PBPs); alteração da permeabilidade da membrana externa bacteriana; e degradação da droga através da produção de enzimas β -lactamases. O principal mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos é a produção de enzimas β -lactamases, que representam um grande problema de resistência bacteriana aos antimicrobianos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016; ALTERTHUM, 2015; OPLUSTIL et al., 2000).

As β -lactamases podem ser encontradas extracelularmente em bactérias Gram-positivas, assim como no espaço periplasmático em bactérias Gram-negativas. O principal grupo de β -lactamases é constituído pelas β -lactamases de espectro estendido (ESBL–*Extended Spectrum-beta-lactamases*), havendo também outros grupos de β -lactamases como AmpC (*Serine- β -Lactamase* capaz de hidrolisar cefalosporinas, podendo ser cromossomais ou plasmidiais) e outras penicilases e cefalosporinases.

Devido à grande variedade das β -lactamases, surgiram sistemas classificatórios para facilitar seu estudo. Os sistemas mais utilizados são os de Ambler (1980) e o de Bush; Jacoby; Medeiros (1995). A classificação de Ambler é baseada na estrutura molecular e similaridade entre as sequências de aminoácidos. Neste esquema, as enzimas são divididas em quatro classes (A, B, C e D). As classes A, C e D são também denominadas *Serine- β -Lactamases*, pois possuem uma serina como principal resíduo catalítico em seu sítio ativo. A classe B abriga as β -Lactamases que utilizam o zinco como cofator em sua atividade catalítica, denominadas *Metallo- β -Lactamases* (DALMARCO; BLATT; CÓRDOVA, 2006; KUMAR et al., 2014; LIVERMORE, 1995; PATERSON; BONOMO, 2005).

O sistema de classificação de Bush é baseado no perfil do substrato de atuação da enzima, além de propriedades físicas e inibitórias. Neste esquema, as enzimas foram divididas em 4 grupos (1-4) e ainda em subgrupos (a-f).

O sistema de classificação das β -Lactamases encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação de β -Lactamases de acordo com os sistemas de classificação de Ambler e de Bush-Jacoby-Medeiros.

Classificação de Bush-Jacoby-Medeiros	Classificação de Ambler	Principais características bioquímicas	Principais substratos
1	C	Não são inibidos pelo ácido clavulânico. Principalmente localizados no cromossomo de bactérias Gram-negativas	Cefalosporinas Ex: AmpC, CMY-2, Fox-1
2a	A	Sofrem inibição pelo ácido clavulânico. Presentes em bactérias Gram-positivas.	Penicilinas
2b	A	Penicilinas de amplo espectro em bactérias Gram-negativas. Inibidas pelo ácido clavulânico.	Penicilinas e cefalosporinas Ex.: TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	β -lactamase de espectro estendido conferindo resistência às cefalosporinas e monobactâmicos. Inibição pelo ácido clavulânico.	Penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos Ex.: TEM-3, SHV-2, CTX-M15, PER-1
2br	A	Reduzida ligação aos inibidores de beta- lactamases	Penicilinas Ex.: TEM-30, SHV-10
2c	A	Modestamente inibida pelo ácido clavulânico	Penicilinas e carbenicilina (PSE-1)
2d	D	Modestamente inibida pelo ácido clavulânico	Penicilinas, oxacilina, cloxacilina (OXA)

Classificação de Bush-Jacoby-Medeiros	Classificação de Ambler	Principais características bioquímicas	Principais substratos
2e	A	Inibida pelo ácido clavulânico	Cefalosporinas
2f	A	Inibida pelo ácido clavulânico	Penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (KPC)
3	B	Metallo- β -lactamases, conferindo resistência à maioria dos β -lactâmicos, exceto monobactâmicos. Não inibido pelo ácido clavulânico.	Penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos
4	ND *	Não são inibidas pelo ácido clavulânico, e ainda não possuem grupo molecular definido	Penicilinas

* Não determinado

Fonte: BUSH; JACOBY, 2010; DALMARCO; BLATT; CÓRDOVA, 2006.

As ESB� possuem a capacidade de hidrolisar o anel β -lactâmico central de penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, levando à formação de um complexo sem atividade biológica. Porém, não conferem resistência aos carbapenêmicos, que são altamente estáveis à atividade hidrolítica da ESB�s (DALMARCO; BLATT; CORDOVA, 2006; SANTOS, 2009). O primeiro caso de cepas produtoras de ESB� ocorreu na Alemanha em 1983 em amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens* (DALMARCO; BLATT; CORDOVA, 2006; SANTOS, 2009).

A ação destas enzimas é bloqueada pelos inibidores de β -lactamases (como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) (SOUSA; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004). Estes antimicrobianos possuem o anel β -lactâmico bastante estável, com a finalidade de se combinar fortemente com as β -lactamases, bloqueando sua ação e restabelecendo a atividade dos β -lactâmicos que são eventualmente associados a estes compostos (ALTERTHUM, 2015).

As ESB� pertencem à classe A de Ambler (são Serine- β -Lactamases, degradam penicilinas e cefalosporinas, geralmente encontradas em plasmídeos) e ao grupo 2be de Bush-Jacoby-Medeiros (degradam penicilinas, cefalosporinas de terceira geração e os monobactâmicos e sofrem ação dos inibidores de β -Lactamase), como por exemplo, TEM, SHV e CTX-M (DALMARCO; BLATT; CORDOVA, 2006; KUMAR et al., 2014; LIVERMORE, 1995; PATERSON; BONOMO, 2005). Existem 193 variantes de SHV, 223 variantes de TEM e já foram descritas 170 variantes de CTX-M. Além dessas três famílias, há outras famílias de enzimas descritas que também possuem atividade de β -Lactamases: OXA, NDM, KPC, ACC, ACT, ADC, BEL, CARB, CFE, CMY, DHA, FOX, GES, GIM, IMI, IMP, IND, LAT, MIR, MOX, PDC, PER, SME, VEB e VIM, mas que são encontradas com menor frequência (DALMARCO; BLATT; CORDOVA, 2006; LAHEY, 2017).

As enzimas ESB�s foram descritas como resultado de genes presentes em plasmídeos, que sofreram mutações com substituições no aminoácido terminal e no sítio ativo enzimático. Estas mutações causam acréscimos na ação das enzimas sobre cefalosporinas, por isso a ação das ESB�s não se limita apenas às penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração, atingindo também as cefalosporinas de terceira geração e os monobactâmicos. As famílias de ESB�s “clássicas” são: TEM (família Temoniera), SHV (Sulfidril variável) e CTX-M (abreviatura de cefotaximase) (DALMARCO; BLATT; CORDOVA, 2006).

TEM-1 é o plasmídeo de resistência a β -Lactâmicos mais encontrado em amostras de *Escherichia coli*, enquanto SHV é encontrada com mais frequência em *Klebsiella pneumoniae*. As ESBLs do tipo TEM são derivadas de TEM-1 e TEM-2. TEM-1 foi descrita pela primeira vez em 1965 a partir de isolados de *Escherichia coli* de um paciente em Atenas, na Grécia, chamado Temoniera (daí a denominação da enzima). TEM-1 é capaz de hidrolisar a ampicilina, porém pouca atividade contra as cefalosporinas. TEM-2 tem o mesmo perfil hidrolítico, porém possui maior atividade (PATERSON; BONOMO, 2005; SOUSA-JUNIOR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004).

SHV refere-se a variável *sulphydryl*. Foi inicialmente descrita em 1983 na Alemanha como uma β -lactamase com uma eficiente hidrólise em cefotaxima, porém menor com ceftazidima. ESBL do tipo SHV é detectada com muita frequência na família *Enterobacteriaceae*, porém já foram relatados casos da produção de SHV em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp (PATERSON; BONOMO, 2005).

ESBL do tipo CTX-M foi identificado no início de 1990 e teria se originado a partir de um plasmídeo contendo um gene pré-existente em cromossomos de *Kluyvera* spp. Estas enzimas são capazes de hidrolisar principalmente cefotaxima, de forma mais eficiente do que a ceftazidima e aztreonam, podendo atuar sobre ceftriaxona e cefepima. É encontrado com frequência em isolados de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Enterobacter* spp e *Morganella* spp. (BONNET et al., 2001; BONNET, 2004; KUMAR et al., 2014; PATERSON; BONOMO, 2005; SOUZA-JUNIOR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004). Muitos genes codificadores de CTX-M estão situados próximos ou dentro de transposons ou de cassetes gênicos, possibilitando a sua rápida disseminação (HOPKINS et al., 2006).

Os plasmídios que possuem o gene codificador de ESBL podem conter genes que codificam resistência a outros antimicrobianos, como aminoglicosídeos, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e cloranfenicol (STÜRENBURG; MACK, 2003).

A identificação inicial (triagem) de bactérias produtoras de ESBLs pode ser feita através do antibiograma com os antimicrobianos “marcadores” (Cefpodoxima, Ceftazidima, Aztreonam, Cefotaxima e Ceftriaxona), os quais possuem pontos de corte sugeridos pelo CLSI no método de difusão do disco. Ao ocasionarem um halo de inibição menor do que o estabelecido para aquele antimicrobiano indica a produção presumida de ESBLs (DALMARCO; BLATT; CÓRDOVA, 2006). A triagem também

pode ser feita através de microdiluição em caldo, e quando ocorrer $CIM \geq 8 \mu\text{g/mL}$ para cefpodoxima e $CIM \geq 2 \mu\text{g/mL}$ para ceftazidima, aztreonam, cefotaxima, ou ceftriaxona, suspeita-se de cepa produtora de ESBL.

Conforme o CLSI (2014), o teste confirmatório para detecção de ESBL é feito através da metodologia de discos combinados, e o microrganismo que apresentar um aumento $\geq 5 \text{ mm}$ na zona de diâmetro de uma cefalosporina (cefotaxima - CTX e/ou cefatazidima - CAZ) combinada com o ácido clavulânico *versus* a zona de diâmetro de quando testado sozinho é confirmado como produtor de ESBL. Outra forma de confirmação preconizada pelo CLSI (2014) é através da microdiluição em caldo (ou em ágar), onde o microrganismo é confirmado como produtor de ESBL ao apresentar uma redução de três diluições para um dos dois agentes antimicrobianos (CTX e CAZ), testados em combinação com o ácido clavulânico *versus* a CIM de quando testado sozinho.

No entanto, outra metodologia tem sido empregada em diversos laboratórios clínicos devido à ausência de discos comerciais contendo cefalosporinas e clavulanato, dificuldade de obtenção de clavulanato no mercado nacional, e aumento da carga de trabalho com o preparo diário dos discos com o inibidor (SAMPAIO, 2008). Esse teste confirmatório para ESBL é denominado de disco aproximação, em que é colocado um disco de amoxicilina com ácido clavulânico no centro da placa e distante a 30 mm dos outros discos de β -lactâmicos: ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona e aztreonam. O efeito sinérgico do inibidor de β -lactamase com o β -lactâmico pode causar um fenômeno conhecido como “zona fantasma”. Trata-se de uma distorção dos halos de inibição entre o disco contendo ácido clavulânico e do antimicrobiano β -lactâmico, confirmando assim a formação de ESBL pela amostra (JARLIER et al., 1988). Quando a bactéria é resistente à cefalosporina, recomenda-se empregar uma distância menor entre os discos (20 mm), para evidenciar a zona fantasma (SOUSA; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004).

O teste presuntivo e o teste confirmatório podem ser realizados na mesma placa de Petri, uma vez que ambos utilizam os mesmos antimicrobianos marcadores, com o objetivo de economizar tempo e material. Conforme o CLSI, os isolados com testes positivos para ESBL devem ser reportados no laudo como resistentes aos antibióticos betalactâmicos e às combinações de betalactamases (mesmo que sensíveis *in vitro*), devendo-se acrescentar uma observação de que os testes laboratoriais sugerem a produção de ESBL (SOUSA; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004).

1.4.3 Resistência às Sulfonamidas

As sulfonamidas são derivadas da sulfanilamida e possuem estrutura semelhante ao ácido paraminobenzóico (PABA). Possuem efeito bacteriostático, inibindo o metabolismo do ácido fólico. Em associação com o trimetoprim possui efeito sinérgico. As sulfonamidas bloqueiam a ação da diidropteroato sintase (DHPS), que catalisa a conversão de PABA em ácido dihidropteróico, enquanto o trimetoprim bloqueia a conversão do ácido dihidropteróico em ácido tetraidrofólico. Este último atua como coenzima na síntese de purinas, metionina, timina e serina. Neste grupo estão incluídos: sulfanilamida, sulfisoxazol, sulfacetamida, ácido para-aminobenzóico, sulfadiazina e sulfametoxazol (ALTERTHUM, 2015; SKÖLD, 2000; TENOVER, 2006).

Até a década de 1970, eram utilizadas apenas sulfonamidas no tratamento de infecções. Sulfametoxazol combinado com trimetoprim (cotrimoxazol) começou a ser utilizado entre as décadas de 1970 e 1980 (ENNE et al., 2001).

A bactéria pode se tornar resistente às sulfonamidas por mutações que causam a superprodução de PABA (ácido paraminobenzóico), alterações estruturais de enzimas que participam do metabolismo do ácido tetraidrofólico ou a célula bacteriana evita a rota metabólica inibida pelas sulfonamidas, sendo capaz de produzir ácido fólico por uma via metabólica alternativa. Outra forma das bactérias se tornarem resistentes é através da aquisição de plasmídeos de resistência que codificam enzimas diidropteroato sintase com alterações, que diminuem sua afinidade com as sulfonamidas. Os genes codificadores dessas enzimas são denominados *sul1*, *sul2* e *sul3* (ALEKSHUN; LEVY, 2007; ALTERTHUM, 2015; ANTUNES et al., 2005; SKÖLD, 2000; SKÖLD, 2001; SOUSA; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004).

O gene *sul1* é encontrado juntamente com outros genes de resistência no segmento conservado 3' de integrons de classe I, enquanto *sul2* geralmente é encontrado em pequenos plasmídeos não conjugativos ou em grandes plasmídeos transmissíveis (ANTUNES et al., 2005; BYRNE-BAILEY et al., 2009; CHANG et al., 2011; SKÖLD, 2000; SKÖLD, 2001). O gene *sul3* foi inicialmente encontrado em plasmídeos, porém posteriormente foi descoberto que estão localizados ao segmento conservado de integrons de classe I (CHANG et al., 2011; CHUANCHUEN; KHEMTONG, 2008; KOOWATANANUKUL; PEIRANO et al., 2005).

1.4.4 Resistência às Tetraciclinas

As tetraciclinas são produzidas por bactérias do gênero *Streptomyces* e possui como principal característica estrutural a presença do tetra anel. Atuam através do bloqueio da síntese de proteínas porque são capazes de se ligar à subunidade 30S da célula bacteriana impedindo a fixação do aminoacil-t-RNA ao sítio A do ribossomo e a formação da cadeia polipeptídica (ALEKSHUN; LEVY, 2007; ALTERTHUM, 2015; SPEER; SHIEMAKER; SALYERS, 1992). Possui atividade bacteriostática e atravessa a membrana plasmática através de transporte ativo e a membrana externa por difusão passiva. Neste grupo estão incluídos: tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, minociclina, doxiciclina e tigeciclina (FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001; ROBERTS, 1996).

Os mecanismos de resistência da célula bacteriana às tetraciclinas incluem a proteção ribossomal e a bomba de efluxo. Com relação à proteção ribossomal, proteínas citoplasmáticas protegem o ribossomo da ação da tetraciclina. No mecanismo de bomba de efluxo, ocorre a expulsão do antimicrobiano do interior celular e sua consequente diminuição da concentração intracelular do antimicrobiano a um nível bem abaixo do necessário para a atividade antibacteriana. Neste mecanismo proteínas associadas à membrana (Tet) são responsáveis pela expulsão da tetraciclina por transporte ativo (BUTAYE; CLOECKAERT; SCHWARZ, 2003; FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001; PEREIRA- MAIA; SILVA; ALMEIDA, 2010; SPEER; SHOEMAKER; SALYERS, 1992).

As proteínas Tet são codificadas por genes *tet*, presentes em plasmídeos ou transposons. Os determinantes de resistência em bactérias Gram-negativas são: *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG* e *tetH* (FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001). Os genes *tetA*, *tetB*, *tetD* e *tetH* estão presentes em transposons, enquanto *tetC*, *tetE* e *tetG* estão presentes em plasmídeos (BUTAYE; CLOECKAERT; SCHWARZ, 2003; GUARDABASSI et al., 2000; MOREIRA et al., 2013).

5 CONCLUSÃO

- As amostras de aEPEC apresentaram um perfil de resistência e genético bastante diversificado, mostrando-se resistentes a diversos antimicrobianos.
- As amostras de aEPEC não apresentaram resistência a nenhuma cefalosporina (com exceção da Cefalotina) e monobactâmico. Porém a identificação de amostras produtoras de ESBL indica que essas podem desenvolver seus mecanismos de resistência quando expostos a esses antimicrobianos ou a medicamentos pertencentes a estas subclasses e que não foram testados.
- As amostras de aEPEC resistentes à Tetraciclina apresentaram valores de CIM entre 32 µg/mL a 256 µg/mL e valores de CBM entre 32 µg/mL a 512 µg/mL (2 a 32 vezes o valor do ponto de corte para resistência a TET ≥ 16 µg/mL), mostrando diferentes potenciais de resistência.
- A maioria das amostras de aEPEC resistentes à Sulfametoxazol/Trimetoprima (18/20) apresentaram valores de CIM maiores do que 256/4864 µg/mL, enquanto que apenas duas amostras apresentaram CIM igual a 256/4864 µg/mL. A CBM da maioria das amostras também foi superior a 256/4864 µg/mL, mostrando potenciais semelhantes de resistência.
- O perfil genético das amostras de aEPEC apresentou prevalência dos genes *tetB*, *sul1* e *bla*_{TEM-1}.
- A presença do gene *Int11* demonstra o potencial destas amostras de aEPEC como veiculadora de genes de resistência para outras bactérias.

REFERÊNCIAS*

ABE, C. M.; TRABULSI, L. R.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; FRANZOLIN, M. R.; TADDEI, C. R.; MARTINEZ, M. B.; PIAZZA, R. M. F.; ELIAS, W. P. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*+ EAF-negative *stx*- genetic profile. **Diag. Microbiol. Infec. Dis.**, v. 64, p. 357-365, 2009.

ADESIJI, Y. O.; DEEKSHIT, V. K.; KARUNASAGAR, I. Antimicrobial-resistant genes associated with *Salmonella* spp. isolated from human, poultry, and seafood sources. **Food Science & Nutrition**, v. 2, p.436-442, 2014.

AFSET, J. E.; BERGH, K.; BEVANGER, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 1015-1019, 2003.

AFSET, J.E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 1137-144, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Antimicrobianos – bases teóricas e uso clínico. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm>. Acesso em 20 ago.2016

AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A.; ONUMA, D. L.; SILVEIRA, W. D.; DE CASTRO, A. F. P. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 115, p. 297-306, 2007.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S.B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v.128, p. 1037-1050, 2007.

ALIKHANI, M. Y.; MIRSALEHIAN, A.; ASLANI, M. M. Detection of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Iranian children with and without diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1159-1163, 2006.

ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: ALTERTHUM, F. (Ed.), **Trabulsi-Alterthum Microbiologia**. 6ªed., Editora Atheneu. São Paulo, 2015. p. 67-78.

* De acordo com:

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

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, v. 289, p. 321-331, 1980.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 48, p. 5-16, 2001.

ANSARI, S.; NEPAL, H. P.; GAUTAM, R.; SHRESTHA, S.; NEOPANE, P.; GURUNG, G.; CHAPAGAIN, M. L. Community acquired multi-drug resistant clinical isolates of *Escherichia coli* in a tertiary care center of Nepal. **Antimicrob. Resist. and Infect. Control**, v. 4, p. 1-8, 2015.

ANTUNES, P.; MACHADO, J.; SOUSA, J. C.; PEIXE, L. Dissemination of Sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v. 49, p. 836-839, 2005.

ARENAS-HERNÁNDEZ, M. M.; MARTÍNEZ-LAGUNA, Y.; TORRES, A. G. Clinical implications of enteroadherent *Escherichia coli*. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, v. 14, p. 386-394, 2012.

BABINI, G. S.; LIVERMORE, D. M. Are SHV beta-lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 2230, 2000.

BAKHSHI, B.; FALLAHZAD, S.; POURSHAFIE, M. R. The occurrence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains among children with diarrhea in Iran. **J. Infect. Chemother.**, v.19, p.615-620, 2013.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BONNET, R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 1-14, 2004.

BONNET, R.; SAMPAIO, J. L.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J. A Novel CTX-M β -Lactamase (CTX-M-8) in Cefotaxime-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 44, p. 1936-1942, 2000.

BONNET, R. ; DUTOUR, 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-2403Gly. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 2269-2275, 2001.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 839-844, 2007.

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

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p. 1211-1233, 1995.

BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Intern. J. of Antimicrob. Agents**, v.22, p. 205-210, 2003.

BYRNE-BAILEY, K. G.; GAZE, W. H.; KAY, P.; BOXALL, A. B. A.; HAWKEY, P. M.; WELLINGTON, E. M. H. Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v.53, p. 696–702, 2009.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional EPEC O serogroups. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p.545-552, 2004.

CARVALHO, V. M., GYLES, C. L.; ZIEBELL, K.; RIBEIRO, M. A.; CATÃO-DIAS, J. L.; SINHORINI, I. L.; OTMAN, J.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Characterization of monkey Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from Neotropical nonhuman primates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1225-1234, 2003.

CASBURN-JONES, A. C.; FARTHING, M. J. G. Management of infectious diarrhea. **Int. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.65, p. 296-305, 2016.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. - "Prof. Alexandre Vranjac". **Monitorização das doenças diarreicas agudas**. São Paulo, 2008

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. - "Prof. Alexandre Vranjac". **Diarreia e a Monitorização da Doença Diarreica Aguda**. São Paulo, 2012.

CERGOLE-NOVELLA, M. C.; GUTH, B. E.; CASTANHEIRA, M.; CARMO, M. S.; PIGNATARI, A. C. First description of *bla*(CTX-M-14)- and *bla*(CTX-M-15)-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **Microb. Drug Resist.**, v. 16, p. 177–184, 2010.

CHANG, C.; LU, P.; LIN, C.; LEE, T.; TSAI, M.; CHANG, L. Integron types, gene cassettes, antimicrobial resistance genes and plasmids of *Shigella sonnei* isolates from outbreaks and sporadic cases in Taiwan. **J. Med. Microbiol.**, v.60, p. 197–204, 2011.

CHEN, S.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; SCHROEDER, C. M.; LU, R.; YANG, H.; MCDERMOTT, P. F. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. **Appl. Environm. Microbiol.**, v.70, p. 1-7, 2004.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 232-260, 2001.

CHUANCHUEN, R.; KOOWATANANUKUL, C.; KHEMTONG, S. Characterization of class 1 integrons with unusual 3' conserved region from *Salmonella enterica* isolates. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 39, p.419-424, 2008.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement*. NCCLS document M100-S24, Wayne, PA: National Committee of Clinical Laboratory Standards, v. 33, n. 1, 2014.

CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microb. Rev.**, v.26, p. 822 – 880, 2013.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 74, p. 417-433, 2010.

DALMARCO, E.M.; BLATT, S.L.; CORDOVA, C.M.M. Identificação Laboratorial de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) – Revisão. **Rev. Bras. Análises Clin.**, v. 38, p. 171-177, 2006.

DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. EPEC's weapons of mass subversion. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.8, p. 28-34, 2005.

DIAS, R. C. B.; dos SANTOS, B. C.; dos SANTOS, L. F.; VIEIRA, M. A.; YAMATOGLI, R. S.; MONDELLI, A. L.; SADATSUNE, T.; SFORCIN, J. M.; GOMES, T. A.; HERNANDES, R. T. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Acta Pathol., Microbiol., Immunol. Scandinavica**, v. 124, p. 299-308, 2016.

DINIZ-SANTOS, D. R.; SILVA, L. R.; SILVA, N. Antibiotics for the empirical treatment of acute infectious diarrhea in children. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 10, p. 217-227, 2006.

ELLIOTT, S. J.; SPERANDIO, V.; GIRÓN, J. A.; SHIN, S.; MELLIES, J. L.; WAINWRIGHT, L.; HUTCHESON, S. W.; MCDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded

virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect Immun.**, v. 68, p. 6115-6126, 2000.

ENNE, V. I.; LIVERMORE, D. M.; STEPHENS, P.; HALL, L. M. C. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. **The Lancet**, v. 357, p. 1325–1328, 2001.

ESTRADA-GARCIA, T.; CERNA, J. F.; PAHECO-GIL, L.; VELÁSQUEZ, R. F.; OCHOA, T. J.; TORRES, J.; DuPONT, H.L. Drug-resistant Diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, p. 1306-1308, 2005.

FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. **São Paulo Med. J.**, v. 118, p. 21-29, 2000.

FLUIT, A. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. J. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, p. 836-871, 2001.

FRANZOLIN, M. R.; ALVES, R. C. B.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T.; BEUTIN, L.; BARRETO, M. L.; MILROY, C. A.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L. R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p.359-363, 2005.

GOMES, T. A.; IRINO, K.; GIRÃO, D. M.; GIRÃO, V. B.; GUTH, B. E.; VAZ, T. M.; MOREIRA, F. C.; CHINARELLI, S. H.; VIEIRA, M. A. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1851-5, 2004.

GOMES, T. A.; ELIAS, W. P.; SCALETSKY, I. C.; GUTH, B. E.; RODRIGUES, J. F.; PIAZZA, R. M.; FERREIRA, L. C.; MARTINEZ, M. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Braz. J. Microbiol.**, Suppl 1, p. 3-30. , 2016.

GOMES, T. A. T.; HERNANDES, R. T. *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC). ALTERTHUM, F. (Ed.), **Trabulsi-Alterthum Microbiologia**. 6ªed., Editora Atheneu. São Paulo, 2015. p. 303-309.

GUARDABASSI, L.; DIJKSHOORN, L.; COLLARD, J. M.; OLSEN, E.; DALSGAARD, A. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. **J. Med. Microbiol**, v.49, p.929-936, 2000.

HARTLAND, E. L.; DANIELL, S. J.; DELAHAY, R. M.; NEVES, B. C.; WALLIS, T.; SHAW, R. K.; HALE, C.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 1483-1492, 2000.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIEIRA, M. A.; GOMES, T. A. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 297, p. 137-49, 2009.

HOPKINS, K. L.; BATCHELOR, M. J.; LIEBANA, E.; DEHEER-GRAHAM, A. P.; THRELFALL, E. J. Characterisation of CTX-M and AmpC genes in human isolates of *Escherichia coli* identified between 1995 and 2003 in England and Wales. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 28, p. 180-192, 2006.

HU, J.; TORRES, A.G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? **Clin. Microbiol. Infect.**, v.8, p. 729 – 734, 2015.

JARLIER, V.; NICOLAS, M. H.; FOURNIER, G., PHILIPPON, A. A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev. Infect. Dis.**, v.10, p. 867-78, 1988.

JORGENSEN, J. H.; MCELMEEL, M. L.; FULCHER, L. C.; ZIMMER, B. L. Detection of CTX-M-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBLs) by testing with MicroScan overnight and ESBL confirmation panels. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 120–123, 2010.

KAPER, J. B. Defining enteropathogenic *Escherichia coli*. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 130-133, 1996.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-38, 2004.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. **Vet. Microbiol.**, v. 106, p. 87-95, 2005.

KUMAR, D.; SINGH, A. K.; ALI, M. R.; CHANDER, Y. Antimicrobial susceptibility profile of extended spectrum β -Lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* from various clinical samples. **Infect. Dis.: Res. Treatment**, v.7, p.1-8, 2014.

LAHEY, 2017. Disponível em: <<http://www.lahey.org/studies>>. Acesso em 15 maio 2017.

LEOMIL, L.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; KRAUSE, G.; SCHMIDT, H.; BEUTIN, L. Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 249, p. 335-342, 2005.

LÉVESQUE, C.; PICHÉ, L.; LAROSE, C.; ROY, P. H. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p. 185-191, 1995.

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

LIWA, A. C.; JAKA, H. Antimicrobial resistance: mechanisms of action of antimicrobial agents. In: MENDEZ-VILA, A. (Ed.). **The battle against microbial pathogens: basic science, technological and advances and educational programs**. p. 876-885, 2015.

LOZER, D. M.; SOUZA, T. B.; MONFARDINI, M. V.; VICENTINI, F.; KITAGAWA, S. S.; SCALETSKY, I. C.; SPANO, L. C. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infect. Dis.**, v. 13, 418, 2013.

MALVI, S.; APPANNANAVAR, S.; MOHAN, B.; KAUR, H.; GAUTAM, N.; BHARTI, B.; KUMAR, Y.; TANEJA, N. Comparative analysis of virulence determinants, antibiotic susceptibility patterns and serogrouping of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* versus typical enteropathogenic *E. coli* in India. **J. Med. Microbiol.**, v. 64, p. 1208-15, 2015.

MARCOS, L. A.; DuPONT, H. L. Advances in defining etiology and new therapeutic approaches in acute diarrhea. **J. Infect.**, v. 55, p. 385-93. 2007.

MARTINO, M. D. V. Métodos para detecção do perfil de sensibilidade das bactérias aos antibióticos. In: ALTERTHUM, F. (Eds.). **Trabulsi-Alterthum Microbiologia**. 6a. ed., Editora Atheneu. São Paulo, 2015, p. 93-97.

MAZEL, D.; DYCHINCO, B.; WEBB, V.A.; DAVIES, J. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p.1568-1574, 2000.

MEMARIANI, M.; PEERAYEH, S. N.; MOSTAFAVI, S. K. S.; SALEHI, T. Z. Detection of class 1 and 2 Integrons among Enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Arch. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 2, p. 1-6, 2014.

MEMARIANI, M.; PEERAYEH, S. N.; SALEHI, T. Z.; MOSTAFAVI, S. K. S. Occurrence of SHV, TEM and CTX-M β -Lactamase genes among Enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea. **Jundishapur J. Microbiol.**, v.8, p.1-8, 2015.

MINARINI, L. A.; GALES, A. C.; DARINI, A.L. Prevalence of community-occurring extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 51, p. 401-402, 2007.

MITTAL, S.; SHARMA, M.; CHAUDHARY, U. Fosfomycin use in multi drug resistant uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Disord. Drug Targets**, v. 15, p. 196-201, 2015.

MOON, H. W.; WHIPP, S. C.; ARGENZIO, R. A.; LEVINE, M. M.; GIANNELLA, R. A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect. Immun.**, v. 41, p. 1340-1351, 1983.

MORA, F.X.; AVILÉS-REYES, R.X.; GUERRERO-LATORRE, L.; FERNÁNDEZ-MOREIRA, E. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) in children under five years old with diarrhea in Quito (Ecuador). **Int. Microbiol.**, v.19, p.157-160, 2016.

MORATO, E. P.; LEOMIL, L.; BEUTIN, L.; KRAUSE, G.; MOURA, R. A.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. **Zoon. Public. Health**, v. 56, p. 229-237, 2008.

MOREIRA, N. M.; SOLA, M. C.; FEISTEL, J. C.; OLIVEIRA, J.J.; FREITAS, F. A Os mecanismos de resistência bacteriana da *Salmonella* sp. frente à utilização de antibióticos. **Enciclop. Biosfera**, v.9, p. 1131-1153, 2013.

MORENO, A. C. R.; FILHO, A. F.; GOMES, T. A. T.; RAMOS, S. T. S.; MONTEMOR, L. P. G.; TAVARES, V. C.; FILHO, L. S.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, p. 50-57, 2010.

MOSQUITO, S.; RUIZ, J.; PONS, M. J.; DURAND, D.; BARLETTA, F.; OCHOA, T. J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from children. **Int. J. Antimicrob Agents**, v.40, p. 544–548, 2012.

MOURA, R. A.; SIRCILI, M. P.; LEOMIL, L.; MATTÉ, M. H.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 7399-408, 2009.

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

NAKAZATO, G.; GYLES, C.; ZIEBELL, K.; KELLER, R.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A.; IRINO, K.; DA SILVEIRA, W. D.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: Characteristics and serotypic relationship to human Enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Vet. Microbiol.**, v. 101, p. 269-277, 2004.

NAKHJAVANI, F. A.; EMANEINI, M.; HOSSEINI, H.; IMAN-EINI, H.; ALIGHOLI, M.; JABALAMELI, F.; HAGHI-ASHTIANI, M. T.; TAHERIKALANI, M.; MIRSALEHIAN, A. Molecular analysis of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 62, p. 191–195, 2013.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NCCLS (CLSI). **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada** - Sexta Edição. NCCLS document M7-A6, Wayne, PA: National Committee of Clinical Laboratory Standards, v. 23, n. 2, 2003a.

NCCLS (CLSI). **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada** - Oitava Edição. NCCLS document M2-A8, Wayne, PA: National Committee of Clinical Laboratory Standards, v. 23, n. 1, 2003b.

NGUYEN, T. V.; PHUNG, V. L.; LE, C. H.; WEINTRAUB, A. Antibiotic resistance in Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in Hanói, Vietnam. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v. 49, p. 816-819, 2005.

NGUYEN R. N.; TAYLOR, L. S.; TAUSCHEK, M.; RONINS-BROWNE, R. M. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, p. 597–603, 2006.

NIKAIDO H. Multidrug resistance in bacteria. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 78, p. 119–146, 2009.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerg. Infect. Dis.**, v.17, p.1791–1798, 2006.

OCHOA, T. J.; SALAZAR-LINDO, E.; CLEARY, T. G. Management of children with infection-associated persistent diarrhea. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 15, p. 229-236, 2004.

OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.5, p. 478–483, 2011.

OPLUSTIL C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TABOUTI, N. R.; SINTO, S. I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. São Paulo: Sarvier, 2000.

PADILLA, G.; COSTA, S. O. P. Genética Bacteriana. In: ALTERTHUM, F. (Ed.), **Trabalho Alterthum Microbiologia**. 6ªed., Editora Atheneu. São Paulo. 2015. p. 37-49.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum β -Lactamases: a clinical update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.18, p. 657–686, 2005.

PEIRANO, G.; AGERSØ, Y.; AARESTRUP, F. M.; RODRIGUES, D. P. Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide-resistant *Shigella* spp. from Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 55, p. 301–305, 2005.

PEREIRA-MAIA, E. C.; SILVA, P. P.; ALMEIDA, W. B. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. **Quim. Nova**, v.33, p. 700-706, 2010.

PIAZZA, R. M. F.; TADDEI, C. R.; FRANZOLIN, M. R.; BUERIS, V.; ELIAS, W. P. Infecções intestinais causadas por *Escherichia coli* – Aspectos microbiológicos. In: FOCACCIA, R.; DIAMENT, D.; FERREIRA, M. S.; SICILIANO, R. F. (Eds.), **Tratado de Infectologia**. 4ªed., Editora Atheneu, São Paulo. 2009.

PINTO, C. O. **Pesquisa de integron de classe I e cassete gênico em *Escherichia coli* recuperadas de indivíduos saudáveis e infectados e em DNA de sedimento contaminado por arsênio**. 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PITONDO-SILVA, A.; NAKAZATO, G.; FALCÃO, J. P.; IRINO, K.; MARTINEZ, R.; DARINI, A. L.; HERNANDES, R. T. Phenotypic and genetic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal children in the Ribeirão Preto metropolitan area, São Paulo State, Brazil. **Acta Pathol., Microbiol., Immunol. Scandinavica**, v. 123, p. 128–135, 2014.

PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. D. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **Lancet Infect. Dis.**, v. 8, p. 159-166, 2008.

PIZARRO-CERDÁ, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell.**, v. 124, p.715 – 727, 2006

QU, M.; LV, B.; ZHANG, X.; YAN, H.; HUANG, Y.; QUAN, H.; PANG, B.; JIA, L.; KAN, B.; WANG, Q. Prevalence and antibiotic resistance of bacterial pathogens isolated from childhood diarrhea in Beijing, China (2010–2014). **Gut Pathog.**, v.8, p. 2-9, 2016.

RAHMANI, M.; PEIGHAMBARI, S. M.; SVENDSEN, C. A.; CAVACO, L. M.; AGERSØ, Y.; HENDRIKSEN, R. S. Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. **BMC Veter. Res.**, v.9, p.1-9, 2013.

RATCHTRACHENCHAI, O. A.; SUBPASU, S.; HAYASHI, H.; BA-THEIN, W. Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli* in Thailand. **J. Med. Microbiol.**, v.53, p. 237–243, 2004.

RIBEIRO, M. O.; GOMES, M. da S.; SENNA, S. G.; ROSETTI, M. L. R.; FONSECA, L. de S. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **J. Bras. Pneumol.**, v.30, p.455-60, 2004.

ROBERTS, M. C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 19, p.1-24, 1996.

ROCHA, F. R.; PINTO, V. P.; BARBOSA, F. C. The spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Brazil: a systematic review. **Microb. Drug. Resistance**, v. 22, p. 301-311, 2016.

SAEED, M. A.; HAQUE, A.; ALI, A.; MOHSIN, M.; BASHIR, S.; TARIQ, A.; AFZAL, A.; IFTIKHAR, T.; SARWAR, Y. A profile of drug resistance genes and integrons in *E. coli* causing surgical wound infections in the Faisalabad region of Pakistan. **J. Antibiotics**, v. 62, p. 319–323, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMPAIO, J. L. M. Consenso em detecção de resistência bacteriana aos antimicrobianos em bacilos Gram-negativos. **Rev. Soc. Bras. Microbiol.**, v. 3, p. 18-27, 2008.

SAMPAIO, J. L.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Braz. J. Microbiol.**, v. 47, Suppl 1, p. 31-37, 2016.

SÁNCHEZ-SANMARTÍN, C.; BUSTAMANTE, V. H.; CALVA, E.; PUENTE, J. L. Transcriptional regulation of the orf19 gene and the tir-cesT-eae operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 2823-2833, 2001.

SANTOS, S. B. Incidência de Enterobactérias produtoras de Betalactamase de Espectro Estendido (ESBL) em um Hospital do Município de Duque de Caxias – RJ. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 41, p. 251-255. 2009.

SENGELØV, G.; AGERSØ, Y.; HALLING-SØRENSEN, B.; BALODA, S. B.; ANDERSEN, J. S.; JENSEN, L. B. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. **Environ Int.**, v. 28, p. 587-595, 2003.

SCALETISKY, I. C.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, p. 534-6, 1984.

SCALETISKY, I. C.; PEDROSO, M. Z.; MORAIS, M. B.; CARVALHO, R. L.; SILVA, R. M.; FABRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U. Association of patterns of *Escherichia coli* adherence to HEP-2 cells with acute and persistent diarrhea. **Arq. Gastroenterol.**, v. 36, p. 54-60, 1999.

SCALETISKY, I. C.; SOUZA, T. B.; ARANDA, K. R.; OKEKE, I. N. Genetic elements associated with antimicrobial resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Brazil. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 1-25, 2010.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A. P.; GAASTRA, W. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, p. 601-604, 2010.

SHAHCHERAGHI, F.; RAHMATI GHEZELGEH, F.; NOBARI, S.; TORABI, E.; MOUSAVI, S. F.; ASLANI, M. M.; SHAHCHERAGHI, F. Identification and characterization of class 1 integrons among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from children under 5 years of age. **Iran. J. Microbiol.**, v. 6, p. 156-162, 2014.

SIGMA. **Resazurin sodium salt**. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r7017?lang=pt®ion=BR>. Acesso em 28 ago.2016.

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

SKÖLD, O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. **Drug Resistance Updates**, v. 3, p.155-160, 2000.

SKÖLD, O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. **Vet. Res.**, v.32, p. 261–273, 2001.

SMITH, H.; SCOTLAND, S.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G.; ROWE, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* infections in the United Kingdom. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 45–49, 1996.

SOUSA-JUNIOR, M. A.; FERREIRA, E. S.; CONCEIÇÃO, G. C. Betalactamases de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **NewsLab**, v. 63, p. 152-174, 2004.

SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Bacterial resistance to Tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 5, p. 387-399, 1992.

STEWART, C. D.; RASHEED, J. K.; HUBERT, S. K.; BIDDLE, J. W.; RANEY, P. M.; ANDERSON, G. J.; WILLIAMS, P. P.; BRITTAIN, K. L.; OLIVER, A.; MCGOWAN JR, J. E.; TENOVER, F. C. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Extended-Spectrum β -Lactamase detection methods. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2864-2872, 2001.

STÜRENBURG, E.; MACK, D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **J. Infect.**, v. 47, p. 273-295, 2003.

SUBRAMANIAN, K.; SELVAKKUMAR, C.; VINAYKUMAR, K. S.; GOSWAMI, N.; MEENAKSHISUNDARAM, S.; BALAKRISHNAN, A.; LAKSHMI, B. S. Tackling multiple antibiotic resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) clinical isolates: a diarylheptanoid from *Alpinia officinarum* shows promising antibacterial and immunomodulatory activity against EPEC and its lipopolysaccharide-induced inflammation. **Intern. J. Antimicrob. Agents**, v. 33, p. 244–250, 2009.

SUNDE, M.; NORSTRO, M. The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.58, p. 741–747, 2006.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am. J. Infect. Control**, v.34, p.S3-S10, 2006.

TILAK, G. P.; MUDALIAR, J. I. Role of Enteropathogenic *Escherichia coli* in Paediatric Diarrhoeas in South India. **Mater. Sociomed.**, v. 24, p. 178-181, 2012.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. Typical and atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 508-513, 2002.

YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, KEN-ICHI.; ENOMOTO, K. Characterization of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 2033-2039, 2003.

WARDLAW, T.; SALAMA, P.; BROCKLEHURST, C.; CHOPRA, M.; MASON, E. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. **Lancet**, n. 375, p. 870-872, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diarrhoeal disease**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>>. Acesso em 22 fev. 2015

WANG, L.; NAKAMURA, H.; KAGE-NAKADAI, E.; HARA-KUDO, E.; NISHIKAWA, Y. Comparison by multilocus variable-number tandem repeat analysis and antimicrobial resistance among atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from food samples and human and animal faecal specimens. **J. Appl. Microbiol.**, v. 122, p. 268-278, 2016.

WOERTHER, P. L.; BURDET, C.; CHACHATY, E.; ANDREMONT, A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. **Clin Microbiol Rev.**, v. 26, p. 744-758, 2013.

WONG, A. R.; PEARSON, J. S.; BRIGHT, M. D.; MUNERA, D.; ROBINSON, K. S.; LEE, S. F.; FRANKEL, G.; HARTLAND, E. L. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. **Mol. Microbiol.**, v. 80, p. 1420-1438, 2011.

WRIGHT, G. D. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug Discovery. **Can. J. Microbiol.**, v. 60, p. 147-154, 2014.

ZAVASCKI, A.P.; CARVALHAES, C.G.; PICÃO, R.C; GALES, A.C. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Rev. Anti-Infect. Ther.** v.1, n.8, p.71-93, 2010.