LEANDRO BARBATO

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

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

São Paulo
2012

LEANDRO BARBATO

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

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Profº Drº Nilton Lincopan

Versão original

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Barbato, Leandro.
Detecção e caracterização de bactérias gram-negativas produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) e AmpC plasmidial isoladas de animais de companhia e de búfalos no estado de São Paulo / Leandro Barbatto. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Nilton Lincopan.

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

Versão do título para o inglês: Detection and charactezation of gram-negative bacteria producers extended spectrum β-lactamases (ESBL) and pAmpC isolated from pets and buffalo in São Paulo.

1. *Escherichia coli* 2. Búfalos 3. CTX-M 4. CTX-M-2 5. CTX-M-8 6. CTX-M-15 I. Lincopan, Prof. Dr. Nilton II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0204/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leandro Barbato.

Título da Dissertação: Detecção e caracterização de bactérias gram-negativas produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) e AmpC plasmidial isoladas de animais de companhia e de búfalos no estado de São Paulo.

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

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

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **532/12** referente ao projeto intitulado: "*Detecção e caracterização de bactérias Gram-negativas produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) isoladas de animais de companhia e búfalos do estado de São Paulo*" sob a responsabilidade de **Leandro Barbato,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH-COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 13 de junho de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais e familiares, a minha namorada, aos meus amigos e a todos que me ajudaram a chegar aqui, mesmo sem saber onde ficava esse "aqui"...

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Profº Drº Nilton Lincopan pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela confiança que depositou em mim e por todas as orientações e ajudas que me prestou nos momentos de maior dificuldade.

Agradeço ao Profº Drº Antonio Fernando Pestana de Castro por ser quem me ensinou antes de todos o que era pesquisa, por me acolher em seu laboratório e por todos os momentos de felicidade que nosso grupo teve em nosso antigo laboratório.

Agradeço aos três Pós- Doutores que me ajudaram muito, muito mesmo, em todos os momentos que eu precisei, Drª Vanessa Bueris, Drº Rodrigo Moura e Drª Patrícia Neves, a vocês, meu muito obrigado por todo tempo gasto comigo mesmo com tantos outros afazeres, unicamente com a intenção de me ensinar.

Agradeço a todos meus colegas de laboratório que me ajudaram, me fizeram rir, ou simplesmente ficaram do meu lado no momento que eu precisava especialmente aos meus grandes amigos Luana Melo e Edmar Silva.

Agradeço a minha namorada Karoline Gonçalves por estar ao meu lado sempre nos bastidores, me encorajando e não me deixando cair, obrigado por ser meu porto seguro!

Agradeço aos meus irmãos, aos meus pais e a toda a minha família, unicamente pelo amor de vocês, sem o qual eu não teria razão para superar todas as dificuldades da vida.

Agradeço as alunas de IC Juliana e Cintia por toda ajuda no desenvolvimento do projeto.

Agradeço aos pesquisadores Prof° Dr° Nilson R. Benites, Drª Priscila Anne Melville e Profª Drª Lílian Gregory pelas cepas gentilmente cedidas para este estudo.

Agradeço o apoio financeiro da FAPESP, CNPq e CAPES.

A vocês, o meu Muito Obrigado!

“O conhecimento nos faz responsáveis”.

Che Guevara

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Reação de inativação do anel β- lactâmico por enzimas ESBL.....16
Figura 2- Distribuição geográfica das cepas produtoras de ESBL de origem humana no Brasil.....18
Quadro 1- Dados clínicos e epidemiológicos dos isolados bacterianos estudados.....22
Quadro 2- Iniciadores usados para amplificação dos genes pesquisados.....25
Figura 3- Esquema de classificação de filogenia de virulência para *Escherichia coli*.....27
Quadro 3- Cepas bacterianas resistentes a pelo menos um antibiótico, espécie bacteriana isolada, ano da coleta, animal de origem, tipo de amostra, e perfil re resistência aos antimicrobianos testados.....34
Quadro 4- Características clínicas e epidemiológicas e caracterização fenotípica e genotípica de cepas resistentes a quinolonas; genótipo de virulência e grupo filogenético dos isolados de *E. coli*.....37
Quadro 5- Características clínicas e epidemiológicas e caracterização fenotípica e genotípica de beta-lactamases adquirida nos isolados estudados; similaridade genética (perfil ERIC-2), genótipo de virulência e grupo filogenético dos isolados de *E. coli*.....38
Figura 4- Dendrograma e perfil genotípico de cepas de *E. coli*, isoladas de búfalos e animais de companhia, produtoras de enzimas β-lactamases.....39

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Percentual de resistência aos antimicrobianos do total de 141 cepas testados pela técnica de Disco difusão.....30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ESBL - "*Extended expectrum β-lactamases*"

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

CTX - Cefotaxima

CAZ - Ceftazidima

CFO - Cefoxitina

CEF - Ceftiofur

NAL - Ácido Nalidixico

CIP - Ciprofloxacina

ENO - Enrofloxacina

TET - Tetraciclina

SUT - Sulfametoxazol

GEN - Gentamicina

AMC - Amixicilina + Ácido Clavulânico

ITU - Infecção do Trato Urinário

bla - β-lactamase

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ABCB - Associação Brasileira de Criadores de Búfalos

PCR - *Polimerase Chain Reaction*

FMVZ - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

UFC - Unidade Formadora de Colônia

CT - Cefotaxima

CTL - Cefotaxima + Ácido Clavulânico

CIM - Concentração Inibitória Mínima

APB - Ácido Fenil Burónico

UV - Ultra Violeta

ETEC - *Escherichia coli* Enterotoxigênica

EPEC - *Escherichia coli* Enteropatogênica

STEC - *Escherichia coli* produtora de Toxina Shiga

EIEC - *Escherichia coli* Enteroinvasiva

ExPEC - Extraintestinal Patogênica *Escherichia coli*

pb - Pares de bases

MLST - Multiloccus sequence typing

EN - Enrofloxacina

CI - Ciprofloxacina

MR - Multirresistente

nd - Não determinado

MRSA - *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... **15**
1.1 Resistência bacteriana por produção de enzimas ESBL (*Extended-spectrum β Lactamases*)..... **15**
1.2 Resistência mediada por AmpC β-lactamase..... **18**
1.3 Resistência as quinolonas..... **19**
1.4 Impacto das ESBL no agronegócio e na medicina veterinária..... **19**
2 OBJETIVOS..... **21**
2.1 Objetivos específicos..... **21**
3 MATERIAL E MÉTODOS..... **22**
3.1 Amostras Bacterianas..... **22**
3.2 Ensaios para verificação de sensibilidade a antimicrobianos..... **22**
3.3 Determinações da concentração inibitória mínima das cepas produtoras de ESBL e resistentes a quinolonas..... **23**
3.4 Teste fenotípico para detecção de ESBL..... **23**
3.5 Teste fenotípico para detecção de pAmpC..... **24**
3.6 Testes genotípicos confirmatórios para ESBL e pAmpC..... **24**
3.7 Testes genotípicos para genes de virulência de *Escherichia coli*..... **24**
3.8 Determinação dos grupos filogenéticos de virulência..... **26**
3.9 Avaliação da relação clonal por ERIC PCR..... **27**
3.10 *Multilocus sequence typing* (MLST)..... **28**
3.11 PCR para genes de resistência a quinolonas..... **28**
3.12 PCR para determinação do sorogrupo O25..... **29**
4 RESULTADOS..... **30**
5 DISCUSSÃO..... **40**
6 CONCLUSÃO..... **47**
REFERÊNCIAS..... **48**

1 INTRODUÇÃO

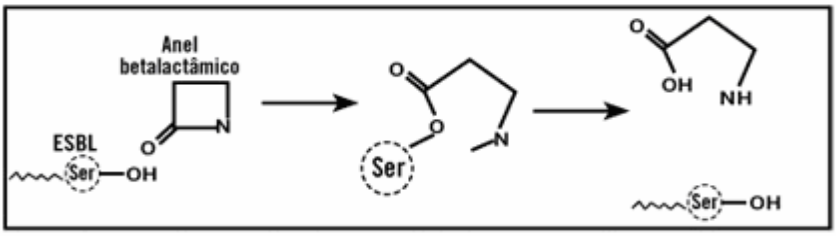
A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um importante problema de saúde pública mundial, inerente ao uso exacerbado de antibacterianos tanto na medicina humana e veterinária como no agronegócio (SILVA; LINCOPAN, 2012). A ampla disseminação de bactérias capazes de expressar enzimas que conferem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

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

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

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

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



Fonte: Silva e Lincopan, 2012.

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

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

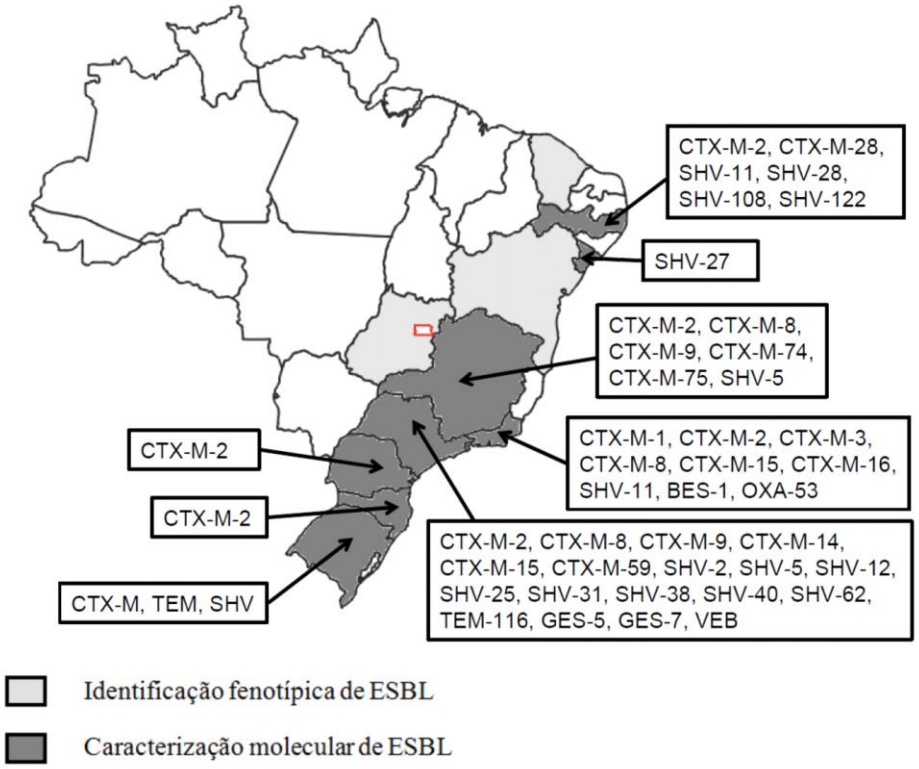
são incluídas no grupo 2d (BUSH, 2010). A maioria das ESBLs são codificadas por genes plasmidiais (STURENBURG et al., 2005), sendo que aproximadamente 123 variantes pertencem ao grupo CTX-M até dezembro de 2011 (CANTÓN; GONZALÉZ-ALBA; GALÁN, 2012). Acredita-se que genes do tipo bla_{CTX-M} tenham uma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

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

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

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

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



Fonte: Silva e Lincopan, 2012.

1.2 Resistência mediada por AmpC β-lactamases

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

1.3 Resistência as quinolonas

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

1.4 Impacto das ESBL no agronegócio e na medicina veterinária

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

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

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

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

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

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

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

2 OBJETIVOS

- Detectar e caracterizar fenotípica e genotipicamente a resistência aos β-lactâmicos em bactérias Gram-negativas provenientes de animais de companhia e de produção (bubalinocultura), assim como investigar sua origem ancestral, e relação clonal.

2.1 Objetivos específicos

- Traçar o perfil fenotípico de susceptibilidade antimicrobiana das cepas estudadas;
- caracterizar os mecanismos de resistência aos β-lactâmicos e a quinolonas através de testes genotípicos;
- definir o grupo filogenético de virulência nos isolados de *Escherichia coli* portadores de genes de resistência*;*
- caracterizar as cepas de *Escherichia coli* quanto ao seu patótipo;
- traçar o perfil de similaridade entre as cepas de *Escherichia coli* produtoras de β-lactamases mediadas por plasmídeos (ESBL e pAmpC) por ERIC-PCR;
- identificar o "S*equence Typing*" para determinar a origem ancestral e similaridade das cepas de *Escherichia coli* produtoras de ESBL e pAmpC por *Multi Locus Sequence Typing* (MLST).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras bacterianas

Foram estudados 141 isolados bacterianos coletados de animais de companhia com infecção urinária atendidos no Hospital Veterinário da USP (amostras cedidas gentilmente pelo Prof° Dr° Nilson R. Benites e pela Drª Priscila Anne Melville, FMVZ-USP); e de amostras de fezes de búfalos provenientes de distintas fazendas de produção do estado de São Paulo (cepas cedidas gentilmente pela Profª Drª Lílian Gregory, FMVZ-USP) (Quadro 1). Todos os ensaios fenotípicos e genotípicos foram realizados utilizando cepas controles, previamente caracterizadas.

Quadro 1- Dados clínicos e epidemiológicos dos isolados bacterianos estudados.

Espécie identificada (*n*)	Animal de origem	Amostra clínica	Patologia causada*
Klebsiella pneumoniae (9)		Urina	ITU
Klebsiela ozanae (1)			
Enterobacter spp. (1)	Cão		
Proteus mirabilis (5)			
Pseudomonas aeruginosa (1)			
Escherichia coli (65)			
Escherichia coli (39)	Búfalo	Fezes	Diarreia
Escherichia coli (19)	Gato	Urina	ITU
Escherichia coli (1)	Periquito	Sangue	Sepse

n- número de cepas analisadas
* ITU- Infecção do trato urinário.

3.2 Ensaios para verificação de sensibilidade a antimicrobianos

Foi usada a metodologia descrita por Kirby-Bauer, seguindo as normas padronizadas pelo CLSI (2009). Foram selecionadas 1 ou mais colônias bacterianas e suspendidas em 3 ml de solução fisiológica estéril, a fim de se obter um inóculo ajustado com a escala 0,5 de McFarland (1-2 X 108 UFC / ml). Após o ajuste da

turvação, foi introduzido no tubo um suabe, que foi pressionado nas paredes a fim de remover o excesso de cultura e, em seguida, foi estriado sobre a superfície do meio Muller-Hinton (meio de cultura utilizado em todos testes fenotípicos em placa descritos a seguir). Após 3 a 5 minutos em temperatura ambiente, para absorção do excesso crescimento bacteriano e umidade na placa, os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, com auxílio de uma pinça estéril. As placas foram incubadas a 35-37°C, por 18 horas. Após o período de incubação foi feita a medição do diâmetro da zona de inibição de crescimento, incluindo o diâmetro do disco, foram utilizados os antimicrobianos: amoxicilina com ácido clavulânico (AMC), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), ácido nalidíxico (NAL), gentamicina (GEN), cefoxitina (CFO), ciprofloxacina (CIP), enrofloxacina (ENO), sulfametoxazol (SUT), tetraciclina (TET) e ceftiofur (CEF).

3.3 Determinações da concentração inibitória mínima das cepas produtoras de ESBL e resistentes a quinolonas

Foram empregadas fitas E-test® ESBL (CT/ CTL) cefotaxima/cefotaxima + ácido clavulânico, E-test® Enrofloxacina (EN) e E-test® Ciprofloxacina (CI) (BIOMERIEUX, Jacarépagua, Rio de Janeiro, Brasil) projetadas para determinar a concentração inibitória mínima de cepas resistentes. Foram empregadas as metodologias e interpretação descritas na bula do fabricante.

3.4 Teste fenotípico para detecção de ESBL

Foi feito o teste sinérgico do duplo disco, no qual os discos de antibacterianos cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) e aztreonam (ATM) foram distribuídos a uma distância de 20 mm de um disco contendo amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) (20/10 µg). Qualquer aumento/distorção da zona de inibição de um dos antibióticos em direção ao disco de amoxicilina + ácido clavulânico foi sugestivo da produção de ESBL (BRUN-BUISSON et al., 1987).

Em seguida, foram empregadas fitas E-test® ESBL cefotaxima/cefotaxima + ácido clavulânico (CT/ CTL) projetadas para confirmar a presença dessas enzimas. Brevemente, após uma noite de crescimento em ágar BHI (*brain and heart infusion ágar)*, os organismos foram suspensos em salina com turbidez equivalente a 0,5 da

escala de McFarland, e então foram estriadas em placa utilizando um suabe. Após secagem por 15 minutos, as fitas de E-test® foram colocadas nas placas, e estas foram incubadas por 18 horas a 35 ºC. A concentração inibitória mínima (CIM) foi interpretada como o ponto de intersecção entre a elipse de inibição com a borda da fita E-test® segundo a recomendação do fabricante.

3.5 Teste fenotípico para detecção de pAmpC

O teste consiste na inibição enzimática pela presença do ácido fenilborónico (APB). Foram usados os discos de antibacterianos cefoxitina (CFO 30 µg), ceftazidima (CAZ 30 µg) e cefotaxima (CTX 30 µg) com e sem associação de APB 10 µg. Foram consideradas positivas para produção de AmpC, as amostras que apresentaram um aumento de 5 mm nos halos de inibição quando combinados com APB (SONG et al., 2007).

3.6 Testes genotípicos confirmatórios para ESBL e pAmpC

A identificação de genes codificadores de ESBLs bla_{TEM}, bla_{SHV} e $bla_{CTX\text{-}M}$ (incluindo $bla_{CTX\text{-}M\text{-}2}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}8}$ e $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$), e dos genes $bla_{CMY\text{-}1}$, $bla_{CMY\text{-}2}$, $bla_{DHA\text{-}1}$, $bla_{DHA\text{-}2}$, bla_{FOX}, bla_{MIR} *e* bla_{ACT} foi realizada pela reação de polimerase em cadeia (PCR). O DNA bacteriano foi obtido pelo método de fervura para todas as reações de PCR descritas a seguir. Nas reações de PCR foram ou serão utilizados os iniciadores e condições descritas no Quadro 2.

O produto amplificado de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, usando o marcador molecular de 100 pares de bases (pb), corados com *Gel Red Nucleic Acid Stain* (Biotium) e visualizado em UV (312nm) com auxílio de um transiluminador ultravioleta (Spectro line), sendo foto documentado pelo sistema EDAS 290 (Kodak).

3.7 Testes genotípicos para genes de virulência de *Escherichia coli*

Foi feita a identificação molecular de genes que codificam fatores de virulência para as amostras de *Escherichia coli* produtoras de ESBL através de PCR. Foram testados os genes para os patótipos: *Escherichia coli* enteropatogênica

(EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) e *Escherichia coli* causadora de infecção extra instestinal (ExPEC). A reação de PCR utilizou iniciadores e condições descritas no Quadro 2.

Quadro 2 - Iniciadores usados para amplificação dos genes pesquisados

Característica	Gene	Sequencia 5'-3'	Pb*	T (°C)**	Referência
ESBL	bla_{TEM}	F:5'GAGTATTCAACATTTCCGTGTC 3' R:5'TAATCAGTGAGGCACCTATCT 3'	861	51	Baraniak, et al., 2005
ESBL	bla_{SHV}	F:5' ATGCGTTATATTCGCCTGTG 3' R:5' GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG 3'	573	53	Tollentino, et al., 2010
ESBL	bla_{CTX-M}	F:5' CGCTTTGCGATGTGCAG 3' R:5'ACCCGCATATGCTTGTG 3'	544	56	Edelstein et al., 2003
ESBL	$bla_{CTX-M-2}$	F:5' GCGACCTGGTTAACTACAATC 3' R:5'CGGTAGTATTGCCCTTAAGCC 3'	351	55	Tollentino, et al., 2010
ESBL	$bla_{CTX-M-8}$	F: 5' CTGGAGAAAAGCAGCGGGGG3' R:5' ACCCAGGATGTGGGTAGCCC3'	320	55	Tollentino, et al., 2010
ESBL	$bla_{CTX-M-15}$	F: 5' CACACGTGGAATTTAGGGACT3' R: 5' GCCGTCTAAGGCGATAAACA3'	550	56	Muzaheed, et al., 2008
AmpC	bla_{CMY-1}	F:5'TGAGCAAGACCCTGACTGC3' R:5'GGAATGTCTGCTCGGTGAC3'	654	52	Aguilar et al., 2009
AmpC	bla_{CMY-2}	F:5'ATAACCACCCAGTCACGC3' R:5'CAGTAGCGAGACTGCGCA3'	631	58	Poppe et al-, 2005
AmpC	bla_{DHA-1}	F:5'TCTGCCGCTGATAATGTCC3' R:5'GCCGCCGGATCATTCAGCGC3'	262	52	Yum, et al., 2005
AmpC	bla_{DHA-2}	F:5'TCTGCCGCTGATAATGTCG3' R:5'TCTGCCGGGTCATTCAACAT3'	298	52	Yum, et al., 2005
AmpC	bla_{FOX}	F:5'AACATGGGGTATCAGGGAGATG3' R:5'CAAAGCGCGTAACCGGATTGG3'	190	52	Pérez-Pérez & Hanson, 2002
AmpC	$bla_{MIR/ACT}$	F:5'TCGGTAAAGCCGATGTTGCCG3' R:5'CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT3'	302	56	Pérez-Pérez & Hanson, 2002
Quinolonas	qnrA (A1 a A6)	F: 5'ATTTCTCACGCCAGGATTTG 3' R: 5'TGCCAGGCACAGATCTTGAC 3'	53	468	Jacoby,G.A.,Gacharna, N. et al.,2009
Quinolonas	qnrB (B1 a B8)	F: 5'CGACCTKAGCGGCACTGAAT 3' R:5'GAGCAACGAYGCCTGGTAGYTG3'	513	53	Jacoby,G.A.,Gacharna, N. et al.,2009
Quinolonas	qnrS (S1 e S2)	F: 5'ACTGCAAGTTCATTGAACAG 3' R: 5'GATCTAAACCGTCGAGTTCG 3'	431	53	Jacoby,G.A.,Gacharna, N. et al.,2009
Quinolonas	QepA	F:5'AACTGCTTGAGCCCGTAGAT 3' R: 5'GTCTACGCCATGGACCTCAC 3'	595	70	Park, Kim et al., 2009
Quinolonas	*Aac(6')-1b*	F:5'TTGCGATGCTCTATGAGTCGCTA3' R: 5'CTCGAATGCCTGGCGTGTTT 3'	459	55	Park, Robicsek et al., 2006

Filogenia de Virulência	*chuA*	F: 5´- ACGAACCAACGGTCAGGAT-3´ R: 5´-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	57	279	Clermont, Bonacorsi e Bingen. (2000)
Filogenia de Virulência	*yjaA*	F: 5´-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-3' R: 5´-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3´	55	211	Clermont, Bonacorsi e Bingen. (2000)
Filogenia de Virulência	TspE4C2	F: 5´-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3´ R: 5´-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3´	55	152	Clermont, Bonacorsi e Bingen. (2000)
Virulência *E. coli*	*eae*	F: 5' ACGTTGCAGCATGGGTAACTC 3' R: 5' GATCGGCAACAGTTTCACCTG 3'	56	815	Gannon et al., 1993
Virulência *E. coli*	*stx1*	F:5' CGCTGAATGTCATTCGCTCTGC 3' R5' CGTGGTATAGCTACTGTCACC 3'	55	302	Blanco et al., 1996c
Virulência *E. coli*	*stx2*	F:5' CTTCGGTATCCTATTCCCGG 3' R:5' CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC 3'	55	516	Blanco et al., 1996c
Virulência *E. coli*	*ipaH*	F:5'CCTTTTCCGCGTTCCTTGA3' R:5'CGGAATCCGGAGGTATTGC3'	56	424	Hartman, 1990
Virulência *E. coli*	*cnf*	F:5' GAACTTATTAAGGATAGT 3' R: 5' CATTATTTATAACGCTG 3'	46	543	Blanco et al., 1996b
Virulência *E. coli*	*pap*	F:5'GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT 3' R:5'AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA3'	63	336	Marklund, 1992
Virulência *E. coli*	*sfa*	F:5'CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC3' R:5'CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA3'	63	411	Le Bouguenec, Archambaud, Labgne. (1992)
Virulência *E. coli*	*aer*	F:5'TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT 3' R:5'AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG 3'	63	602	Falbo, Famiglittali e Caprioli. (1992)
Virulência *E. coli*	*lt*	F:5' GGGGATCCAGAGAAGAACCCTGGA3' R:5GGGAATTCGCTTAGTTTTTTCTGTGT 3'	50	450	Piazza et al, 2012***
Virulência *E. coli*	*st*	F:5' CATATGTGGATGCCATGTTCCGG 3' R:5' CTCGAGATAGCACCCGGTACAAG 3'	56	170	Piazza et al, 2012***
Virulência *E. coli*	*hly*	F:5'AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGC3'. R:5'ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA3'.	63	1177	Yamamoto, et al., 1995
Sorogrupo O25	*gndbis* *rfbO25a*	F:5′-ATACCGACGACGCCGATCTG-3′ R:5′-GAGATCCAAAAACAGTTTGTG-3′	59	313	Clermont, et al., 2006
ERIC-PCR	*Eric-2*	5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'	52	-	Sneath, 1973

*Pb- Pares de bases
**T(ºC)- Temperatura de anelamento em graus Celsius
*** Os *"primers"* de *lt* e *st* foram gentilmente cedidos pela Drª Roxane Piazza, não publicados.

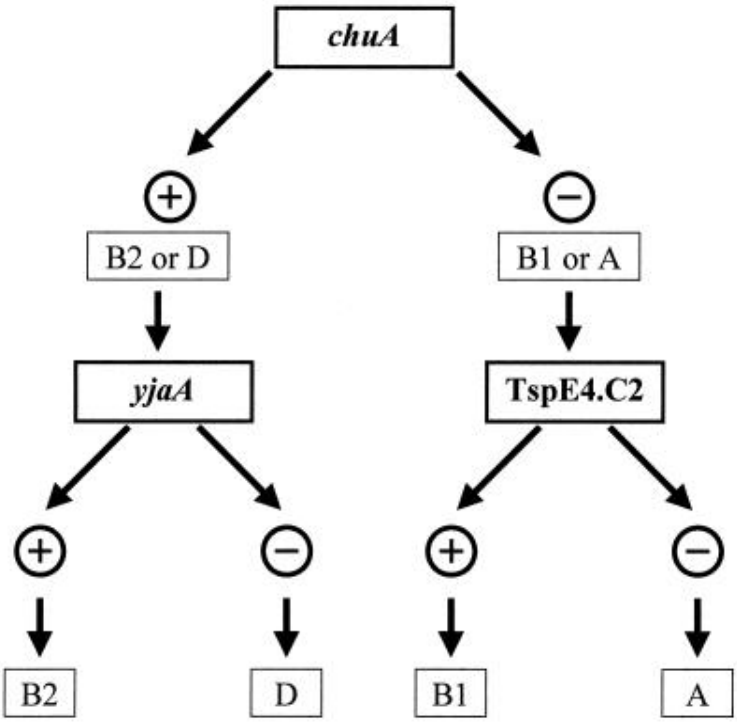
3.8 Determinação dos grupos filogenéticos de virulência

A determinação dos grupos filogenéticos das amostras de *E. coli* selecionadas foi feita através da amplificação dos genes *chuA* e *yjaA* e do fragmento TspE4 por PCR, conforme metodologia descrita por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000). A reação de PCR utilizou iniciadores e condições descritas no Quadro 2.

Para amplificação do gene *chuA* foi aumentada a temperatura de anelamento descrita no artigo de citado com a finalidade de aumentar a especificidade da reação.

O produto amplificado de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5 %, usando o marcador molecular de 100 pares de bases (pb) e corado com *Gel Red Nucleic Acid Stain* (Biotium) e visualizado em UV (312 nm) com auxílio de um transiluminador ultravioleta (Spectro line), sendo foto documentado pelo sistema EDAS 290 (Kodak).

Figura 3 - Esquema de classificação de filogenia de virulência para *Escherichia coli*



Fonte: Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000).

3.9 Avaliação da relação clonal por ERIC PCR

Foram determinadas as relações clonais entre cepas de *Escherichia coli* produtoras de ESBL e AmpC através da técnica de ERIC PCR. Essa tipagem é baseada na amplificação de fragmentos de DNA conservados em Enterobactérias. Foi usado um *primer* único denominado ERIC-2 (Quadro 2) (SNEATH, 1973). O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 1,5%, corado com *Gel Red Nucleic Acid Stain* (Biotium) e visualizado em UV (312nm) com auxílio de um transiluminador ultravioleta (*Spectroline*), e analisado pelo software *Bionumerics*

(*Applied Maths, Kortrijk, Belgium*), cepas com pelo menos 90% de similaridade foram considerados clones.

3.10 *Multilocus sequence typing* (MLST)

Foram amplificados por reações de PCR os genes conservados (*housekeeping*) *adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA* e *recA* com os respectivos iniciadores (Quadro 2) das cepas de *Escherichia coli* produtoras de enzimas CTX-M e CMY-2, e posteriormente purificados e sequenciados. As sequencias de DNA foram analisadas com o programa SEQMAN, e convertidas em arquivos FASTA. As sequencias geradas foram carregadas através *site* do Instituto Pasteur (MLST *Databases at the ERI*, University College Cork) para obtenção das *sequence types* (ST). (http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli).

As informações obtidas sobre a origem dos ST foram extraídas da planilha disponível para download do site da “MLST Databases at the ERI, University College Cork” no seguinte endereço eletrônico: http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli/GetTableInfo_html.

3.11 PCR para genes de resistência a quinolonas

Foram testados genotipicamente as amostras resistentes a ciprofloxacina e/ou enrofloxacina. A reação de PCR utilizou iniciadores e condições descritas no Quadro 2.

O produto amplificado de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, usando o marcador molecular de 100 pares de bases (pb) e corado com *Gel Red Nucleic Acid Stain* (Biotium) e visualizado em UV (312 nm) com auxílio de um transiluminador ultravioleta (Spectro line), sendo foto documentado pelo sistema EDAS 290 (Kodak).

3.12 PCR para determinação do sorogrupo O25

Foi determinado através de reação de PCR padronizada por a presença do amplicon de *rfbO25a* que apresenta positividade em 89% das cepas de *Escherichia coli* do sorogrupo O25 (CLERMONT et al., 2007).Esta técnica foi realizada apenas para a amostra de *Escherichia coli* produtora de CTX-M-15. Esta reação de PCR utilizou iniciadores e condições descritas no Quadro 2.

O produto amplificado de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, usando o marcador molecular de 100 pares de bases (pb) e corado com *Gel Red Nucleic Acid Stain* (Biotium) e visualizado em UV (312nm) com auxílio de um transiluminador ultravioleta (Spectro line), sendo foto documentado pelo sistema EDAS 290 (Kodak).

4 RESULTADOS

O presente trabalho de monitoramento abordou dois diferentes grupos de estudos ainda não avaliados no Brasil, no que se refere aos aspectos fenotípicos e genotípicos da resistência aos antibacterianos de uso humano e veterinário, com ênfase na resistência adquirida aos β-lactâmicos mediada pela produção de enzimas do tipo β-lactamases de amplo espectro (ESBL). Adicionalmente, foi investigada a presença de AmpC plasmidial e genes que conferem resistência a quinolonas. Nos testes de sensibilidade antimicrobiana de Kirby-Bauer, foram testadas as 141 cepas como uma pré-triagem bacteriana. Este teste, utilizando 11 antimicrobianos, apresentou o seguinte percentual de resistência (Tabela 1).

Tabela 1 - Percentual de resistência aos antimicrobianos do total de 141 cepas testados pela técnica de disco-difusão (Kirby-Bauer).

Antimicrobiano	Sigla	Percentual de cepas resistentes (%)
Cefotaxima (Uso Humano)	CTX	12/141 (8,5)
Ceftiofur (Uso Veterinário)	CEF	10/141 (7,09)
Ciprofloxacina (Uso Humano)	CIP	43/141 (30,49)
Enrofloxacina (Uso Veterinário)	ENO	44/141 (31,20)
Ceftazidima	CAZ	5/141 (3,54)
Cefoxitina	CFO	8/141 (5,67)
Ácido Nalidíxico	NAL	62/141 (43,97)
Tetraciclina	TET	58/141 (41,13)
Sulfametoxazol	SUL	41/141 (29,07)
Gentamicina	GEN	11/141 (7,80)
Amoxicilina com ácido clavulânico	AMC	8/141 (5,67)

No primeiro grupo foram caracterizados isolados de *E. coli* (n= 39) recuperados de amostras de fezes de búfalos com diarreia, sendo escolhidas para posterior análises, todos os isolados que apresentaram resistência a qualquer tipo de fluoroquinolona e/ou cefalosporina de terceira geração de uso humano

(ciprofloxacina) e animal (enrofloxacina) e/ou cefamicina, correspondendo a 18/39 (46.15%) dos isolados de *E. coli* analisados. No Quadro 3 são apresentados os perfis de resistência dos isolados selecionados para posterior análise molecular, os quais apresentaram predominantemente um perfil de MR como previamente definido pela resistência exibida a ≥ 3 agentes antibacterianos pertencentes a diferentes classes de antibióticos (MAGIORAKOS et al., 2012). Apresentaram o perfil de MR 10 das 18 cepas selecionadas, (55.55%) e 2 com perfil de MR das 39 amostras não foram selecionadas para estudo genotípico devido ao seu perfil de resistência. O principal problema foi a alta resistência às fluoroquinolonas de uso humano (ciprofloxacina= 17/18, 94,44% de resistência) e veterinário (enrofloxacina= 18/18, 100% de resistência), sendo que a resistência cruzada para ambos quimioterápicos foi confirmada em 17/18 (94,44%) isolados de *E. coli* estudados. Foram identificados por PCR os genes que conferem resistência a quinolonas em 3 isolados, *qnrA* (1/18, 5.55%) e *qnrB* (2/18, 11.11%) (Quadro 4).

O segundo problema foi a resistência a cefalosporinas de amplo espectro, evento não esperado. A resistência a cefotaxima (humana) foi observada em 4/18 (22.22%) isolados de *E. coli*, enquanto que a resistência a seu análogo veterinário ceftiofur foi confirmada em 2/18 (11.11%) isolados analisados. Adicionalmente foi identificado um isolado (5.55%) de *E. coli* resistente a cefoxitina, uma cefamicina com amplo espectro de atividade. De fato, a caracterização molecular por PCR e sequenciamento confirmou a presença de genes codificando ESBLs do tipo CTX-M-8 em 3 isolados, e o gene CMY-2 do tipo pAmpC em uma cepa de *E. coli*, fenômeno ainda não relatado por estudos epidemiológicos mundiais no que se refere à bubalonicultura (Quadro 5). Um fato curioso foi que mesmo se tratando de isolados recuperados de fezes de búfalos com diarréia, não foi confirmada a presença de genes característicos de patotipos diarreiogênicas, e de fato, estes isolados pertenceram ao grupo filogenético B1 de baixa virulência que caracteriza genótipos de *E. coli* comensal que forma parte do trato gastrointestinal (Quadros 4 e 5). Além disso, os isolados não apresentaram uma relação clonal (Figura 4), o que é uma característica da microbiota de *E. coli* de humanos e animais.

O segundo grupo investigado correspondeu a animais de companhia apresentando sinais e sintomas de infecção urinária (ITU). Foram coletas 101 amostras, 82 provenientes de cães e 19 de gatos, todos atendidos no Hospital veterinário da USP. Em cães, a ordem de freqüência de bactérias Gram-negativas

produtoras de ITU foi: *E. coli* (65/82, 79%) > *K. pneumoniae* (9/82, 11%) > *Proteus mirabilis* (5/82, 6%) > *P. aeruginosa* (1/82, 1,2%), *Enterobacter* spp. (1/82, 1,2%) e *Klebsiella ozanae* (1/82, 1,2%). Já em gatos todos os casos de ITU por bactérias Gram-negativas foram produzidos exclusivamente por *E. coli* (Quadro 1).

Para os animais de companhia o critério de seleção dos isolados para caracterização molecular foi o mesmo utilizado para búfalos (i.e., resistência para qualquer fluoroquinolona e/ou cefalosporina de amplo espectro e/ou cefamicina).

Nas amostras de cães foram identificadas 27/82 (32.92%) isolados com estas características, correspondendo a 21 cepas de *E. coli*, 2 cepas de *K. pneumoniae*, 1 cepa de *K. ozaenae*, 1 cepa de *P. aeruginosa,* 1 de *Proteus mirabilis* e 1 de *Enterobacter spp* respectivamente No Quadro 3 são apresentados os perfis de resistência dos isolados selecionados, para posterior análise molecular, os quais apresentaram predominantemente um perfil de MR (15/27, 55.55%) (MAGIORAKOS et al., 2012). Assim como em búfalos, o principal problema em cães foi a alta resistência às fluoroquinolonas de uso humano (ciprofloxacina= 20/27 isolados, 74.07% de resistência) e veterinário (enrofloxacina= 20/27 isolados, 74.07% de resistência), sendo que a resistência cruzada para ambos quimioterápicos foi confirmada em 19/27 (70.37%) dos isolados. Já ao nível de espécie, tanto o único isolado de *Proteus mirabilis* como um isolado de *K. pneumoniae* e um de *K. ozaenae* mostraram resistência cruzada para enrofloxacina e ciprofloxacina; em quanto que a única cepa de *P. aeruginosa* apresentou resistência exclusiva a enrofloxacina. Especificamente, no caso de *E. coli*, 16/20 isolados apresentaram resistência a fluoroquinolonas de uso humano e animal (Quadro 3).

Nas amostras de gatos foram identificadas 5/19 (26%) isolados com perfil de resistência às cefalosporinas de amplo espectro e/ou fluoroquinolonas de uso humano/veterinário (Quadro 3). Como citado anteriormente, casos de ITU em gatos foram associados exclusivamente com *E. coli*, as quais exibiram fenótipo MR, sendo que em 4/5 isolados a resistentes foi expressa tanto para fluoroquinolonas humanas como veterinárias.

Com relação às cefalosporinas de amplo espectro e cefamicinas, dentre os 32 isolados resistentes recuperados de UTI do grupo de animais de companhia, foram identificadas 8 cepas (33%) com fenótipo ESBL e/ou pAmpC, 7 das quais foram isoladas de cães (5 *E. coli*, 1 *K. pneumoniae*, 1 *P. aeruginosa*) e uma cepa (*E. coli*)

foi isolada a partir da amostra de urina de um gato (Quadro 5). Neste grupo, a análise molecular por PCR e sequenciamento confirmou a produção das β-lactamases adquiridas CTX-M-15 (*E. coli* de cão n=1), CTX-M-2 (*E. coli* de cão n=2 e *P. aeruginosa* de cão n=1); (*E. coli* de gato n=1), CTX-M-8 (*K. pneumoniae* de cão n=1), CMY-1 (*E. coli* de cão n=1) CMY-2 (*E. coli* de cão n=2) e DHA-1 (*E. coli* de cão n=1). Foram detectadas também por PCR 3 cepas portadoras de genes de resistência as quinolonas, uma cepa produtora de *aac(6')-1b,*uma produtora de *qnrS* e uma produtora de *qnrS* e *qnrA* (Quadro 4).

Finalmente, durante a realização do estudo foi encaminhado pelo Laboratório de Ornitopatologia (Prof° Dr° Antonio Piantino Ferreira), um isolado de *E. coli* MR recuperado da hemocultura de um periquito que foi a óbito por sepse com falência múltipla de órgãos. O isolado foi resistente à gentamicina, ciprofloxacina, enrofloxacina, ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina, tetraciclina, ácido nalidixico, amoxicilina/clavulânico e sulfametoxazol-trimetoprim, e a caracterização molecular revelou a produção da ESBL CTX-M-2 (Quadros 4 e 6).

A análise da filogenética de virulência em *E. coli* no grupo animais de companhia denotou o predomínio dos grupos filogenéticos de alta virulência B2 e D (Tabela 5 e 6), o que estaria diretamente relacionado com os casos de ITU e sepse. De fato, a presença de genes *pap*, *cnf1* e *aer*, que caracterizam patotipos de ExPEC e UPEC foram identificados em 3 cepas de *E. coli*.

A tipagem dos isolados de *E. coli* por ERIC-PCR revelou um dendrograma com grande diversidade clonal (Figura 4), o que foi confirmado pela técnica de MLST (*Multiloccus Sequence Typing*), que caracterizou todas as cepas de *E. coli* testadas com ST (*Sequence Type*) diferentes (Quadro 5). A cepa número 53 de *E.coli* produtora de CTX-M-15 foi negativa no teste de PCR para detecção de cepas do grupo O25, e foi classificada com um novo variante de ST pela técnica de MLST, denominado ST 3263, a cepa 107 também gerou o novo ST 3395. As demais amostras apresentaram STs conhecidos e já identificados anteriormente, em alguns casos, causadores de infecções como por exemplo infecção do trato urinário e meningite em humanos e animais (Quadro 5).

Quadro 3 - Cepas bacterianas resistentes a pelo menos um antibiótico, espécie bacteriana isolada, ano da coleta, animal de origem, tipo de amostra, e perfil resistência aos antimicrobianos testados.

Cepa	Animal de origem/ Amostra	Espécie bacteriana	Ano da coleta	Perfil de resistência[1]	Fenótipo (MR+/MR)[2]
1	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	CTX, NAL, CIP, ENO, TET	MR+
2	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, CIP, ENO, TET	MR-
3	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, CIP, ENO	MR-
4	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, CIP, ENO, TET, SUT	MR+
5	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, SUT	MR-
6	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, CIP, ENO, TET	MR-
7	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	CTX, CEF, NAL, CIP, ENO	MR-
8	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, CIP, ENO, TET, SUT	MR+
9	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	CTX, CEF, NAL, CIP, ENO	MR-
10	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, CIP, ENO, TET, SUT	MR+
11	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	CTX, CFO, NAL, CIP, ENO, TET, SUT, AMC	MR+
12	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, CIP, ENO, TET, SUT	MR+
13	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, ENO, TET, SUT	MR+
14	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL,CIP, ENO, TET, SUT	MR+
16	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, CIP, ENO, TET	MR-
17	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, CIP, ENO, TET, SUT	MR+
18	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, TET, SUT	MR+
19	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, CIP, ENO, SUT	MR-
20	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, CIP, ENO, TET	MR-
22	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, CIP, ENO, TET, SUT	MR+
23	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, TET, SUT	MR+
26	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, TET	MR-
27	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	NAL, TET	MR-
29	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	TET	MR-
32	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	TET, SUT	MR-
34	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	TET	MR-
38	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	TET	MR-
39	Búfalo/ Fezes	*Escherichia coli*	2010	TET	MR-
40	Periquito/ Sangue	*Escherichia coli*	2010	CTX, CAZ , CFO, NAL, CIP, ENO, TET, SUT, GEN, AMC	MR+

41	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, CIP, ENO, TET	MR-
42	Gato/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, TET, SUT	MR+
44	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, TET	MR-
45	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	CTX, NAL	MR-
46	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, AMC	MR-
48	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	CIP, SUT	MR-
53	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	CTX, CAZ, CFO, CEF, NAL, CIP, ENO, TET, SUT, AMC	MR+
60	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL	MR-
61	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	AMC, TET, ENO, CIP, NAL	MR+
64	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL	MR-
65	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, CIP, ENO, TET, SUT	MR+
67	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	CTX, CAZ, CFO, CEF, AMC	MR+
69	Gato/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, CIP, ENO, TET, SUT, GEN	MR+
70	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	TET	MR-
71	Cão/ Urina	*Enterobacter spp*	2011	CFO	MR-
73	Gato/ Urina	*Klebsiella pneumoniae*	2011	CIP, ENO, TET, SUT	MR+
74	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, CIP, ENO	MR-
77	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, CIP, ENO, SUT, GEN	MR+
79	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, CIP, ENO, TET, SUT, GEN	MR+
81	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL	MR-
83	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, CIP, ENO, TET, SUT, GEN	MR+
84	Cão/ Urina	*Klebsiella pneumoniae*	2011	NAL	MR-
85	Cão/ Urina	*Proteus mirabilis*	2011	TET	MR-
88	Gato/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, TET, SUT	MR+
90	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	CTX, CAZ, CFO, CEF, NAL, CIP, ENO, TET, SUT, GEN, AMC	MR+
91	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, TET, SUT	MR+
93	Cão/ Urina	*Proteus mirabilis*	2011	TET, SUT	MR-
94	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL	MR-
96	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, CIP, ENO, SUT, GEN	MR+
97	Cão/ Urina	*Klebsiella pneumoniae*	2011	TET, SUT	MR-
98	Gato/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, CIP, ENO	MR-
99	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, CIP, ENO, GEN	MR-
101	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	TET, SUT	MR-
103	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL	MR-

105	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, TET	MR-
107	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	CEF, NAL, CIP, ENO	MR-
108	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	TET	MR-
109	Cão/ Urina	*Klebsiella pneumoniae*	2011	NAL, CIP, ENO, CFO, AMC	MR+
110	Cão/ Urina	*Proteus mirabilis*	2011	TET, SUT	MR-
112	Cão/ Urina	*Proteus mirabilis*	2011	TET	MR-
114	Cão/ Urina	*Klebsiella pneumoniae*	2011	CTX, CEF	MR-
115	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	TET	MR-
117	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, CIP, ENO, TET, SUT	MR+
118	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	CTX, CEF, NAL, TET, SUT	MR+
119	Gato/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, CIP, ENO, TET, SUT	MR+
120	Cão/ Urina	*Proteus mirabilis*	2011	NAL, CIP, ENO, TET, SUT	MR+
121	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	TET	MR-
123	Gato/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL	MR-
125	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	TET	MR-
127	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	TET, SUT	MR-
128	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	TET, SUT	MR-
130	Cão/ Urina	*Klebsiella ozaenae*	2011	NAL, CIP, ENO	MR-
132	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, CIP, ENO, TET	MR-
135	Cão/ Urina	*Pseudomonas aeruginosa*	2011	CFO, CEF, ENO, TET	MR+
136	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, CIP, ENO, TET, SUT	MR+
137	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	NAL, CIP, ENO, GEN	MR-
138	Gato/ Urina	*Escherichia coli*	2011	CTX, CAZ, CEF, NAL, CIP, ENO, SUT, GEN	MR+
140	Gato/ Urina	*Escherichia coli*	2011	GEN	MR-
141	Cão/ Urina	*Escherichia coli*	2011	SUT	MR-

[1] CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; CFO, cefoxitina; CEF, ceftiofur; NAL, ácido nalidixico; CIP, ciprofloxacina; ENO, enrofloxacina; TET, tetraciclina; SUT, sulfametoxazol-trimetoprim; GEN, gentamicina; AMC, amoxacilina/clavulânico.

[2] MR+, Multiresistente; MR-, Não Multirresistente (Magiorakos et al., 2012).

Linha amarela- Cepas provenientes de amostras de Búfalos selecionadas para estudos genotípicos

Linha azul- Cepa proveniente de amostras de periquito selecionada para estudos genotípicos

Linha verde- Cepas provenientes de amostras de Cães selecionadas para estudos genotípicos

Linha rosa- Cepas provenientes de amostras de Gatos selecionadas para estudos genotípicos

Quadro 4 - Características clínicas e epidemiológicas e caracterização fenotípica e genotípica de cepas resistentes a quinolonas; genótipo de virulência e grupo filogenético dos isolados de *E. coli*.

Cepa	Espécie	Ano da coleta	Animal de origem/ amostra	CIM CIP[1]	CIM ENO[2]	Genótipo	Genótipo de Virulência[3]	Grupo filogenético
7	*E. coli*	2010	Búfalo/ Fezes	4	8	*qnrA*	-	B1
10	*E. coli*	2010	Búfalo/ Fezes	8	≥32	*qnrB*	-	B1
11	*E. coli*	2010	Búfalo/ Fezes	≥32	≥32	*qnrB*	-	B1
53	*E. coli*	2011	Cão/ Urina	≥32	≥32	*aac(6')-1b*	-	B1
73	*K. pneumoniae*	2011	Cão/ Urina	≤0,25	2	*qnrA e qnrS*	*nd*	*nd*
130	*K. ozaenae*	2011	Cão/ Urina	16	16	*qnrS*	*nd*	*nd*

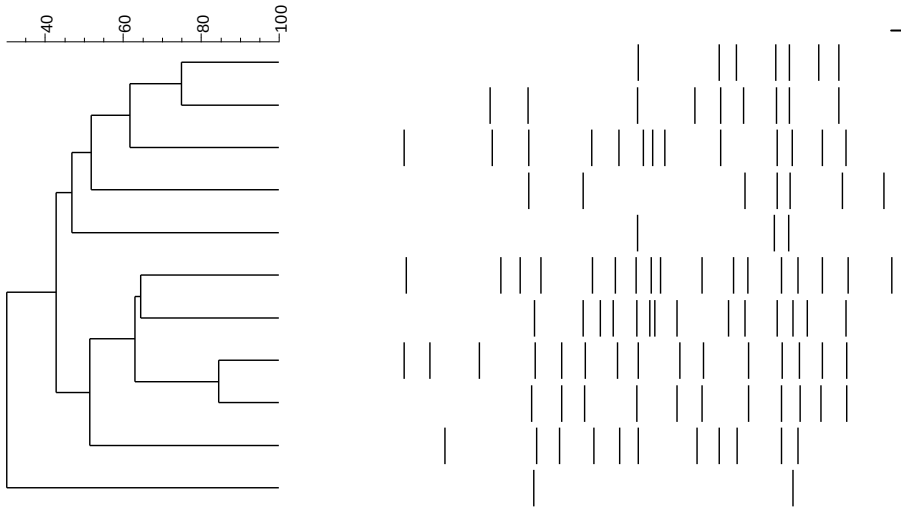
[1] CIP, ciprofloxacina
[2] ENO, enrofloxacina
[3]-, genes não identificados
nd, não determinado

Quadro 5- Características clínicas e epidemiológicas e caracterização fenotípica e genotípica de beta-lactamases adquirida nos isolados estudados; similaridade genética (perfil ERIC-2), genótipo de virulência e grupo filogenético dos isolados de *E. coli*

Cepa	Espécie e *Sequence Typing* (ST)	Ano da coleta	Animal de origem/ amostra	Fenótipo β-lactamase	CIM (µg/mL) CT/CTL[1]	Genótipo β-lactamase	Genótipo de Virulência[2]	ERIC-2 profile	Grupo filogenético de Virulência
1	*E. coli* ST 224	2010	Búfalo/ Fezes	ESBL	4,0/0,64	CTX-M-8	-	F	B1
7	*E. coli* ST 2179	2010	Búfalo/ Fezes	ESBL	6,0/ 0,64	CTX-M-8	-	H	B1
9	*E. coli* ST 2308	2010	Búfalo/ Fezes	ESBL	6,0/ 0,32	CTX-M-8	-	I	B1
11	*E. coli* ST 205	2010	Búfalo/ Fezes	AmpC	nd	CMY-2	-	K	B1
40	*E. coli* ST 2113	2010	Periquito/Sangue	ESBL	≥16,0/ 0,47	CTX-M-2	*cnf1, pap*	J	D
53	*E. coli* ST 3263	2011	Cão/ Urina	ESBL/AmpC	≥16,0/ 0,47	CTX-M-15/CMY-1	*pap, aer*	G	B2
67	*E. coli* ST 372	2011	Cão/ Urina	AmpC	nd	CMY-2	*pap, aer*	C	B2
90	*E. coli* ST 744	2011	Cão/ Urina	ESBL/AmpC	≥16,0/ ≥1,0	CMY-2/DHA-1	-	D	A
107	*E. coli* ST 3395	2011	Cão/ Urina	ESBL	≥16,0/ 0,47	CTX-M-2	-	A	B2
118	*E. coli* ST 457	2011	Cão/ Urina	ESBL	≥16,0/ 0,32	CTX-M-2	-	E	D
138	*E. coli* ST 155	2012	Gato/ Urina	ESBL	≥16,0/ 0,64	CTX-M-2	-	B	B1
114	*K. pneumoniae*	2011	Cão/ Urina	ESBL	≥16,0/ 0,23	CTX-M-8	nd	nd	nd
135	*P. aeruginosa*	2011	Cão / Urina	ESBL/AmpC	≥16,0/ ≥1,0	CTX-M-2	nd	nd	nd

[1]CT/CTL, cefotaxima/cefotaxima + ácido clavulânico.
[2] -, genes não identificados.
[3] novo ST encontrado, ainda não nomeado pelo grupo responsável
nd, não determinado

Figura 4- Dendrograma e perfil genotípico de cepas de *E. coli*, isoladas de búfalos e animais de companhia, produtoras de enzimas β-lactamases (ESBL e pAmpC). O dendrograma foi realizado utilizando o software BioNumerics (*Applied Maths*). Tolerância 1%, otimização 0,5%.



Cepa	Perfil ERIC-2
107	A
138	B
67	C
90	D
118	E
1	F
53	G
7	H
9	I
40	J
11	K

5 DISCUSSÃO

A atual crise da antibioticoterapia tem levantado a necessidade de gerar políticas públicas sobre uso racional de antibacterianos. Infelizmente, no Brasil, este tipo de ação tem sido direcionada ao uso de antibióticos na medicina humana, sendo que na área veterinária e no agronegócio existe uma defasagem, muito provavelmente decorrente da falta de informação sobre o impacto do uso de antibacterianos nestas áreas, junto com a falta de estudos epidemiológicos que permitam conhecer o atual panorama da resistência antibacteriana em bactérias isoladas de animais de companhia e de produção, principalmente no que se refere à caracterização molecular de novos eventos genéticos amplamente conhecidos na medicina humana. Para isto, ferramentas de biologia molecular permitem avaliar o impacto do uso irracional dos antibióticos a partir da caracterização de genes de resistência adquiridos e mobilizados por elementos altamente promíscuos como plasmídeos. Adicionalmente, ferramentas moleculares permitem visualizar e monitorar a disseminação destes determinantes de resistência identificando fontes e veículos que hospedam bactérias MR que podem ser transferidos para o ser humano, para o ambiente ou para outros animais, assim como, permitem esclarecer se existe uma origem clonal de cepas MR que podem ter adquirido um caráter endêmico ou hipotetizar se existe uma seleção de bactérias na própria microbiota de animais, incluindo o próprio ser humano, decorrente do uso continuo e/ou contato direto com antibacterianos seja por alimentos que contem resíduos antibióticos (principalmente no caso de rações em animais de produção) ou tratamentos e profilaxia de doenças infecciosas, muitas das quais seguem uma conduta empírica onde o uso de antibacterianos de amplo espectro é privilegiado.

Tendo em consideração este importante problema de saúde pública, o presente estudo apresenta dados inéditos no Brasil em duas diferentes áreas: i) a bubalonicultura, um mercado em expansão no Brasil e; 2) em animais de estimação, no que se refere a casos de infecção urinária.

Consideramos importante estender nossa pesquisa para estes grupos uma vez que no caso da bubalonicultura, é um novo foco do agronegócio que permitiria avaliar desde suas origens o impacto do uso de antimicrobianos. Por

outro lado, uma vez que este mercado visa a produção de insumos de consumo humano nacional e de exportação, a qualidade e segurança associada com a possibilidade de veiculação de bactérias resistentes e/ou seus genes é importante de considerar, quanto a epidemiologia e potencial de disseminação.

Já para o grupo de animais de estimação, assim como, para o ser humano, a ITU é um das principais causas de consulta e atendimento nos serviços de saúde humana e veterinária. Epidemiologicamente, a ITU independente do grupo animal afetado, é causada principalmente por bactérias Gram-negativas, com claro predomínio de *E. coli*. Assim, tratamentos antibacterianos humanos e veterinários deveriam ser idênticos quanto a seleção de antibióticos e quimioterápicos. Da mesma forma, considerando a ITU um problema principalmente comunitário, a etiologia da infecção reconhece uma origem endógena, onde bactérias da própria microbiota intestinal podem chegar a colonizar a uretra levando a instauração da ITU. Epidemiologicamente, devido ao grau de relação emocional entre animais de estimação e seres humanos, existe uma espécie de relação simbiótica que poderia se transformar em uma cadeia de transmissão dos principais agentes de ITU e/ou outro tipo de bactéria como o MRSA.

Diversos estudos têm detectado a presença de bacilos Gram-negativos carregando genes codificadores de ESBL em animais de companhia e animais de corte, porém no Brasil, estes estudos ainda têm pequenas proporções, além de fato de ainda não ter sido descrita a presença de cepas de *Escherichia coli* portadoras de genes $bla_{CTX\text{-}M\text{-}2}$ e $bla_{CTX\text{-}M\text{-}8}$ e $bla_{CMY\text{-}2}$ em búfalos.

Um estudo feito por Borriello et al. (2011) teve como principal objetivo, identificar cepas *Escherichia coli* patogênicas isoladas de búfalos na Itália, esse estudo mostrou uma prevalência de 1,8% *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e 6,8% de *Escherichia coli* produtora de Toxina de Shiga (STEC), enquanto essa pesquisa aponta que 100% (N= 4) das cepas de *Escherichia coli* produtoras de β- lactamases isoladas de búfalos são comensais segundo a pesquisa de fatores de virulência, e na classificação de Clermont, todas são pertencentes ao grupo B1.

Já para as amostras de animais de companhia, um estudo publicado por Osugui et al. (2008) com 45 amostras de *Escherichia coli* causadoras de ITU

sendo 33 de cães e 7 de gatos, mostrou 47%, 33% e 31% de positividade para *pap, sfa* e *cnf1* respectivamente.

Um outro estudo publicado em março deste ano por Harada, Nakai e Kataoka (2012) utilizando 104 cepas de *Escherichia coli* causadoras de ITU provenientes de cães e gatos, relatou a presença de 34,6% de *pap*, 54,8% de *sfa*, 51,9% de *aer* e 51,0% de *cnf*, dessas cepas, 4.8 foram classificadas como pertencentes ao grupo A, 12,5 como grupo B1, 61.5 como grupo B2 e 21,2 como grupo D na classificação de virulência de Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000). Este estudo detectou em menor porcentagem a presença de cepas ExPEC ou UPEC, no entanto, foram testadas para os fatores de virulência apenas as cepas portadoras de genes de resistência, o que pode nos levar a falsa conclusão de as amostras virulentas estão em pequena porcentagem do total de cepas, já que se tem levantado a hipótese que cepas que carregam genes de resistência, carregam em menor freqüência genes de virulência e vice-versa (LAVIGNE et al., 2006).

Quanto à resistência mediada por genes ESBL, nosso estudo revelou a presença de genótipo ESBL em 5,94% (n= 6) de cepas de *E. coli* resistentes do total de amostras de cães e gatos sendo que destes 66,66% (n=4) foi mediado por $bla_{CTX\text{-}M\text{-}2}$, 16,66% (n=1) por $bla_{CTX\text{-}M\text{-}8}$ e 16.66% (n=1) por $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15.}$ Um artigo recente publicado por Tamang et al. (2012) identificou entre 628 cepas de *E. coli* isolada de cães de rua na Coréa do Sul, 18 cepas resistentes a cefotaxima, e confirmou o genótipo $bla_{CTX\text{-}M}$ em 12 destas cepas sendo estas 1 $bla_{CTX\text{-}M\text{-}3}$, 1 $bla_{CTX\text{-}M\text{-}55}$, 3 $bla_{CTX\text{-}M\text{-}24}$, 5 $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$, 1 $bla_{CTX\text{-}M27}$ e 1 $bla_{CTX\text{-}M\text{-}65}$. Com relação a estes dados, nenhuma destas variantes de CTX-M foi encontrada no presente estudo.

Outro estudo desenvolvido na Ásia por Sun et al. (2010), com 240 cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães e gatos na China, identificou 41.3% de cepas produtoras de ESBL pelo teste sinérgico do duplo disco, foi detectada também a incidência de CTX-M-15 em 6 isolados (6,18% das cepas produtoras de ESBL), sendo que o grupo de CTX-M mais prevalente foi CTX-M-14, com 45 isolados, enquanto este trabalho detectou apenas uma cepa produtora de CTX-M-15 (16,6% das cepas de *Escherichia coli* produtoras de ESBL de cães e gatos) e nenhuma CTX-M-14.

Um artigo Norte Americano publicado por O'Keefe et al. (2010) relata pela primeira vez nos Estados Unidos a presença de cepas *E. coli* produtora de ESBL isoladas do trato urinário de cães e gatos. Das 150 cepas isoladas, 60 foram sugestivas para ESBL na detecção por MicroScan, desses 60 isolados, destes, foram identificados 9 cepas $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$, 1 cepa $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$, além de 53 cepas portadoras de $bla_{CMY\text{-}like}$.

Outro trabalho descrito por Moreno et al. (2008), no Chile, identificou dentre 70 cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães e gatos, 20% (14 cepas) produtoras de ESBL o que representa quase quatro vezes mais que a porcentagem obtida neste trabalho.

Muitos trabalhos tem identificado a presença de genes que conferem resistência a fluoroquinolonas, um estudo feito por Gales et al. (2000), revelou mutações nos genes *gyrA* e *parC* em cepas de *E. coli, K. pneumoniae* e *P. mirabilis* no estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Santa Catarina.

Atualmente tem sido publicados estudos revelando a resistência as fluoroquinolonas mediadas por genes plasmidiais, um estudo feito com bactérias da família Enterobacteriacea por Fontes et al. (2012) revelou a presença de genes *qnr*-like em 7% das cepas estudadas em rios urbanos de São Paulo. Outro estudo realizado no Brasil, no Rio de Janeiro por Peirano et al. (2010) revelou a presença de 44% de *aac(6')-Ib-cr*; e 16% *qnrB,* o que mostra que os dados encontrados neste trabalho não são inesperados, uma vez que cepas contendo genes de resistência a quinolonas tem sido amplamente disseminados no Brasil e no mundo (FERRARI et al., 2011; MINARINI et al., 2008; PEIRANO et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2010).

Diversos estudos tem descrito o clone ST131 O25:H4 relacionado ao gene $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ e ao grupo B2 de virulencia (BLANCO et al., 2009; CLERMONT et al., 2008; PEIRANO et al., 2009). Este estudo identificou o gene $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ em uma cepa de *E. coli* também classificada como pertencente ao grupo B2 de virulencia, mas negativa para rfbO25a, o que indica que esta não pertence ao sorogrupo de *E. coli* O:25, amplamente disseminado na Europa.

Neste estudo identificamos dois novos "*sequence typing*", sendo este o primeiro reporte mundial do ST 3263 e do ST 3395. Ainda é cedo para afirmar, mas ao que parece, o gene $bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$ não esta apenas associado ao ST 131 como se tem pesquisado exaustivamente. Assim, este resultado sugere novas

linhagens bacterianas como possíveis carregadoras de genes que tem causado grandes problemas para a saúde pública atual, e quem sabe, podem estar em ascendência, o que não é possível afirmar devido ao número restrito de pesquisas que vem sendo desenvolvidas para o diagnóstico molecular dessas bactérias, talvez devido ao custo que estes testes geram para a rotina laboratorial.

A identificação dos demais ST foi realmente surpreendente, pois além da grande variedade de sequencias encontradas, podemos verificar que nem todos os clones pesquisados haviam sido antes relacionados a bactérias com importantes mecanismos de resistência.

Dentre as cepas isoladas de fezes de búfalos, a cepa Nº1 foi identificada como ST 224, que já havia sido anteriormente encontrada na Ghana, na África no ano de 1997 como uma *E. coli* de origem humana, não patogênica e sem descrição de resistência, no entanto no ano de 2004 este clone foi identificado em 3 cepas de *E. coli* isoladas na cidade de Matosinhos em Portugal em amostras coletadas em uma praia, sendo as 3 cepas, produtoras de enzimas CTX-M, sendo classificado o ST 224 como um dos 3 clones mais encontrados entre as 45 cepas analisadas (SIMOES et al., 2010). Neste ano (2012), esse mesmo clone foi descrito em Beijing na China como uma cepa patogênica causadora de infecção de ferida isolada de humano, produtora de NDM-1. A cepa Nº7 havia sido descrita em Fuzhou na China no ano de 2009 como uma cepa ESBL, não patogênica isolada de humano causadora de infecção hospitalar, e as cepas Nº9 ST 2308 e Nº11 ST 205 não foram até então descritas como portadoras de genes de resistência, sendo a ST 2308 isolada de frango na Dinamarca, não patogênica e pertencente ao grupo B1 de virulência, e a ST 205 descrita em Ghana, na África, como não patogênica no ano de 1997, e também em Nottinghan na Europa, como causadora de infecção urinária em humanos.

Nas cepas isoladas de cães foram identificadas também grandes variações de ST. Foi identificado na cepa Nº 67 o ST 372, um clone amplamente descrito nos últimos anos na América do Sul, América do Norte e principalmente na Europa. Inicialmente descrito em 1985 na Alemanha como um clone patogênico causador de septicemia em frangos, este clone voltou a ser identificado em San Francisco nos EUA em 2002 causando septicemia em

humanos, e em 2003 foi identificado no Brasil em casos de meningite bacteriana. Este clone em 2004 foi relatado também em Berlin como causador de cistite em cães e em 2005 foi novamente descrita no Brasil na cidade do Rio de Janeiro causando infecção do trato urinário em humanos. Este ST foi identificado também por diversas vezes na Alemanha causando patologias relacionadas ao trato urinário como pielonefrite e cistite em cães e gatos. Essas cepas foram sorotipadas e apresentaram em sua maioria o sorotipo O18:H5.

Os últimos relatos encontrados referentes ao clone ST 372 que foi identificado na cepa N°67 foram em Madrid no ano de 2008 e em Nottinghan em 2009, sendo esta ultima descrição ainda relacionada a infecção do trato urinário. Este trabalho relata a detecção dessa cepa pela terceira vez no Brasil isolada também de cão, produtora de CMY-2 e com genes de virulência típicos de UPEC (*pap* e *aer*), pertencente ao grupo filogenético B2 de alta virulência.

A cepa Nº90 foi classificada como ST 744, esse ST foi identificada no ano de 2006 no Hopital Beaujon em París na França como uma *E. coli* de origem humana também não patogênica pertencente ao grupo filogenético de virulência A, no entanto não foram publicados dados relativos a resistência a antimicrobianos, esses dados condizem com o resultado dessa pesquisa, pois também não foram identificados genes de virulência nessa cepa e a mesma também foi classificada como pertencente ao grupo filogenético de virulência A.

A *E.coli* Nº118 foi classificada como ST 457, este ST também isolada na Europa no *Stepping Hill* Hospital na Inglaterra, foi isolada de um paciente com infecção urinária, sendo esta também uma cepa patogênica, como também pode ser verificado neste trabalho com a classificação D para o grupo filogenético de virulência.

A *E.coli* Nº138 classificada como ST 155, foi encontrada inicialmente na Nigéria em 1995, como uma cepa causadora de diarreia em humanos, no ano seguinte foi descrita em Ghana como não patogênica. Em 1999 foi identificada na Alemanha como causadora de sepse em um pato; em 2006 foi identificada como ETEC causando diarreia bovina; em 2009 na França como amostra ambiental de soja e por último, isolada de água em 2009 novamente na França, como uma *Escherichia coli* produtora de ESBL.

Quanto ao ST 2113 identificado na cepa Nº40 isolada de sangue de periquito, existe pouca informação, apenas foi isolada na Coréia do Sul de um cão, sem informações sobre virulência e perfil de resistência.

6 CONCLUSÃO

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

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

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

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MORENO, A.; BELLO, H.; GUGGIAANA, D.; 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, p. 203-208, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

.