

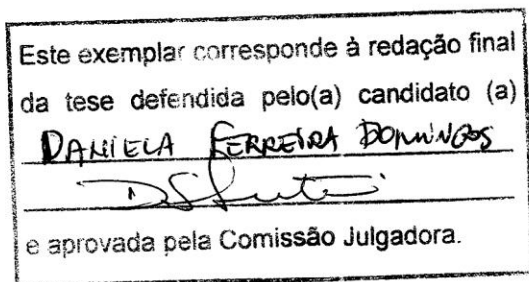
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Daniela Ferreira Domingos

“DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE β -LACTAMASE DE
ESPECTRO-ESTENDIDO (ESBL) EM CEPAS DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE CÃES”



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Campinas, 2010.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

D713d

Domingos, Daniela Ferreira

Detecção e identificação de beta-lactamase de espectro-estendido (ESBL) em cepas de *Escherichia coli* isoladas de cães / Daniela Ferreira Domingos. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Domingos da Silva Leite.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Beta-lactamase de espectro-estendido. 2. Cães. 3. *Escherichia coli*. 4. Multiresistência. I. Leite, Domingos da Silva. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Detection and identification of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* strains isolated from dog.

Palavras-chave em inglês: Extended-spectrum beta-lactamases; Dogs; *Escherichia coli*; Multiresistance.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Mestre em Microbiologia.

Banca examinadora: Domingos da Silva Leite, Valéria Maia de Oliveira, Márcio Garcia Ribeiro.

Data da defesa: 29/04/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 29 de abril de 2010.

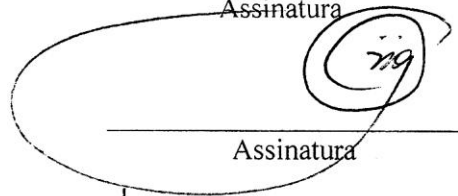
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite (orientador)



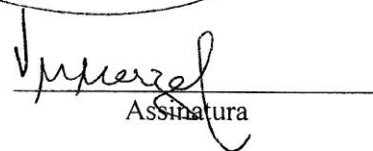
Assinatura

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro



Assinatura

Dra. Valéria Maia Merzel



Assinatura

Prof. Dr. Carlos Emílio Levy

Assinatura

Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini

Assinatura

“O valor da educação em uma faculdade de ciências não está em aprender muitos fatos, mas em exercitar a mente para pensar algo que não pode ser aprendido de livros texto.”

(Albert Einstein)

Dedico esse trabalho aos meus pais Márcio e Maria Roseli pelo esforço, dedicação e compreensão em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

A Deus, infinitamente justo e bom,
O que seria de mim sem a fé que eu tenho nele.

Aos meus pais,
Pela sólida formação dada até minha juventude que me proporcionou a continuidade nos estudos até a chegada a pós-graduação. Eles me fizeram estudar por acreditarem que a única herança que os pais realmente podem deixar aos seus filhos é a moral e os estudos.

Ao meu querido namorado, amigo, companheiro Felipe,
Pelo amor, paciência, incentivo e colaboração fundamental para o desenvolvimento e conclusão desta etapa da minha vida. E que sempre esteve comigo nos momentos mais difíceis e também nos mais alegres.

À minha avó,
Pelas orações e palavras de incentivo.

A toda a minha família,
Que sempre me apoiou.

Aos meus segundos pais Cláudio e Daia e, aos meus irmãos que não tive, Fernando, Márcio e Marcelo pelo carinho e acolhimento.

Ao Prof. Domingos da Silva Leite,
Pela paciência e competência com que orientou a minha dissertação e o tempo que generosamente me dedicou transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos.

Ao Prof. Márcio Garcia Ribeiro,
Por ter me cedido as amostras deste trabalho e por participar de minha pré-banca e banca com sugestões valiosíssimas.

À Profa. Valéria,
Pela participação em minha banca e correção minuciosa da minha dissertação.

Ao Dr. Márcio José da Silva,
Pela paciência e pela incansável disposição em colaborar no sequenciamento das minhas amostras.

Ao Leonardo Andrade, da USP de Ribeirão Preto,
Pela paciência e colaboração no sequenciamento das minhas amostras.

Ao doutorando Gustavo Lacerda,
Pelo auxílio na montagem das minhas sequências.

À Amanda,
Pela “consultoria” no momento da discussão desse trabalho.
À bióloga Mirtis e ao técnico Erivaldo,

Pelo apoio, ensinamento e disponibilidade durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Monique,

Pela sua amizade, paciência e incansável disposição em me ajudar e, também por tudo que me ensinou e colaborou na execução deste trabalho.

Aos minhas colegas de laboratório Cláudia, Mônica, Higa, Carla e Vanessa,
Pelas “ajudinhas” e também pelos momentos de distração na hora do café.

À Ana,

Pelos ensinamentos, apoio técnico e companheirismo.

Aos meus novos amigos Zzé, Osmar, Luige, Desiree e Vanessa,
Pela amizade, apoio e momentos de distração durante a correria do Mestrado.

Às minhas amigas Ju e Juju,

Pela amizade e companheirismo desde a época da graduação, sempre juntas nessa caminhada.

Ao CNPQ,

Pela concessão da bolsa de Mestrado.

À secretária Lourdes,

Pela infinita paciência para ajudar em toda parte burocrática do curso.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia e do curso de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para que este trabalho consiga atingir aos objetivos propostos.

Figura 1.	Esquema de amplificação do gene <i>bla</i> _{CTX-M} para o sequenciamento.	56
Figura 2.	Esquema da amplificação do gene <i>bla</i> _{TEM} para o sequenciamento.	58
Figura 3.	Efeito esperado das amostras ESBL+, as setas indicam a deformação no halo ocorrido pelo efeito do ácido clavulânico. A. Amostra 16C. B. Amostra 31C. ..	63
Figura 4.	Ocorrência dos genes de β -lactamases.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Origem dos nomes das β -lactamases.	33
Tabela 2.	Protocolo padrão para a PCR.	52
Tabela 3.	<i>Primers</i> para a determinação dos grupos β -lactamases.	53
Tabela 4.	<i>Primers</i> para a determinação dos grupos filegenéticos.	54
Tabela 5.	<i>Primers</i> para a determinação dos integrons.	55
Tabela 6.	<i>Primers</i> utilizados no sequenciamento de gene <i>bla</i> _{CTX-M}	57
Tabela 7.	<i>Primers</i> utilizados no sequenciamento de gene <i>bla</i> _{TEM}	58
Tabela 8.	Análise quantitativa do perfil de resistência das amostras de <i>E. coli</i> isoladas de cães.	62
Tabela 9.	Análise do perfil de resistência dos grupos das amostras de <i>E. coli</i> isoladas de cães.	63
Tabela 10.	Perfil de resistência das amostras que apresentaram fenótipo ESBL+.	64

Quadro 1.	Perfil de resistência das amostras com integron de classe 1 e classe 2.	67
------------------	--	----

PRÓLOGO	17
I. INTRODUÇÃO	18
1. Resistência a antimicrobianos	19
2. Antimicrobianos β -lactâmicos	21
2.1. Transporte dos compostos β -lactâmicos	21
2.2. Mecanismo de ação	22
3. Enzimas β -lactamases	23
3.1. Classificação	24
3.2. Beta-Lactamases de Espectro-Estendido (ESBL)	25
3.3. Grupos das β -lactamases	26
3.3.1. Grupo TEM β -lactamase	27
3.3.2. Grupo SHV β -lactamase	28
3.3.3. Grupo CTX-M β -lactamase	29
3.3.4. Grupo OXA β -lactamase	30
3.3.5. Grupos raros de β -lactamases	31
4. Uso de agentes antimicrobianos em animais	33
5. Resistência bacteriana em animais	36
6. Transferência de resistência bacteriana entre animais e seres humanos	37
7. Animais domésticos como reservatório de bactérias resistentes	38
8. Bactérias de origem animais produtoras de β -lactamases	39
9. Detecção de ESBL em animais de companhia	40
10. Integrans	41
10.1. Integrans de resistência	42
10.1.1. Integrans de classe 1	42
10.1.2. Integrans de classe 2	44
10.1.3. Integrans de classe 3	45
11. Filogenia	45
II. OBJETIVOS	47
1. Objetivo geral	48
2. Objetivos específicos	48
III. MATERIAL E MÉTODOS	49
1. Amostras bacterianas	50
2. Teste de sensibilidade microbiana (antibiograma)	50
3. Detecção fenotípica de ESBL – Método da aproximação de disco	51
4. Detecção dos genes de β -lactamases	51
4.1. Extração de DNA bacteriano	51
4.2. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR	51
4.3. Eletroforese em Gel de Agarose	53
5. Filogenia	54
6. Ocorrência e diversidade de integrans	54

7. Sequenciamento pela técnica de “ <i>cromossomo walking</i> ou <i>primer walking</i> ”	55
7.1. Extração de DNA genômico	55
7.2. Sequenciamento do gene <i>bla</i> _{CTX-M}	56
7.2.1. Amplificação do gene <i>bla</i> _{CTX-M}	56
7.2.2. Reação de sequenciamento do gene <i>bla</i> _{CTX-M}	57
7.3. Sequenciamento do gene <i>bla</i> _{TEM}	57
7.3.1. Amplificação do gene <i>bla</i> _{TEM}	57
7.3.2. Reação de sequenciamento do gene <i>bla</i> _{TEM}	58
7.4. Montagem dos <i>contigs</i> e análise das sequências de nucleotídeos	59
IV. RESULTADOS	60
1. Perfil de resistência bacteriana	61
2. Detecção de ESBL	63
3. Detecção dos genes de resistência de β -lactamase	64
4. Classificação filogenética	65
5. Ocorrência, diversidade e análise de integrons	65
6. Sequenciamento	68
6.1. Sequenciamento do gene <i>bla</i> _{TEM}	68
6.1.1. Amostra 16C	69
6.1.2. Amostra 57	70
6.1.3. Amostra 31C	71
6.1.4. Alinhamento do gene <i>bla</i> _{TEM-1} das amostras 57, 16C e 31C	72
6.2. Sequenciamento do gene <i>bla</i> _{CTX-M}	73
6.2.1. Amostra 16C	73
V. DISCUSSÃO	75
VI. CONCLUSÕES	85
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
VIII. ANEXOS	104

O número de animais de companhia tem crescido substancialmente na sociedade atual, com estimativas de 48 milhões de cães e gatos no Brasil. A relação entre animais de companhia e os humanos mudou radicalmente nos últimos anos, esses estão em contato mais próximo com humanos. Como consequência dessas mudanças, agentes antimicrobianos, incluindo antibióticos usados no tratamento de infecções humanas, tem sido utilizados em cães. O objetivo deste trabalho foi investigar fenotipicamente a ocorrência de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) em amostras de *Escherichia coli* isoladas de cães e identificar os genes de resistência nestas amostras. A presença e variedade de integrons nas amostras de *E. coli* foi analisada. A classificação das amostras nos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D também foram investigadas. Dentre 158 amostras de *E. coli* isoladas de cães sendo 51 de ITU (infecção do trato urinário), 52 de piometra e 55 de fezes de cães saudáveis, foram selecionadas 67 amostras que apresentavam pelo menos uma marca de resistência aos β -lactâmicos. As amostras selecionadas: 41 isoladas de ITU, 20 isoladas de piometra e seis isoladas de fezes de animais saudáveis, foram submetidas a testes de sensibilidade microbiana pelo método de difusão de disco. A produção de ESBL foi verificada pelo método de aproximação de disco. A identificação dos genes das β -lactamases foi realizada em ensaios de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com *primers* específicos para os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES-1}, *bla*_{OXA-10}, *ampC* e *cmx*. A classificação filogenética (*chuA*, *yjaA*, TspE4.C2), bem como a detecção de integrons das classes 1 e 2 (*intI1* e *intI2*) também foram realizadas por PCR. Os resultados dos antibiogramas mostraram elevada resistência aos β -lactâmicos de 1ª geração, ampicilina (82,0%) e cefalexina (62,7%) entre as amostras selecionadas. Resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos de 3ª e 4ª geração e ao monobactam foi observada em 7,5% das amostras. As amostras também apresentaram resistência aos antimicrobianos tetraciclina (82,0%), trimetoprim-sulfametoxazol (62,7%), enrofloxacin

(35,8%), florfenicol (34,3%) e ciprofloxacina (32,3%). A expressão fenotípica de ESBL foi observada em duas amostras (3,3%), ambas isoladas de animais saudáveis. Na análise genotípica, foram identificados os genes *bla*_{TEM}, (98,5%), *ampC* (95,5%), *bla*_{CTX-M} (35,8%), *bla*_{SHV} (6%) e *cmv* (2,9%) destacando que os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *cmv* apresentaram-se associados ao *bla*_{TEM} e ao *ampC*. Pelo sequenciamento foi possível identificar as β -lactamases do tipo TEM-1 e CTX-M-2. Na classificação filogenética as amostras foram agrupadas nos grupos B2 (59,7%), B1 (25,4%) e A (14,9%). Dentre as 67 amostras com marcas de resistência aos β -lactâmicos, o gene *int* foi detectado em 26,9% , das quais 71,4% da classe 1 e 28,6% da classe 2. Por outro lado, dentre as 91 amostras sem marcas de resistência a β -lactâmicos, somente 3,3% apresentaram integrons, sendo todos da classe 1. As amostras com integrons foram mais comumente alocadas nos grupos filogenéticos A e B1. A presença de ESBL, de genes de resistência e integrons em *E. coli* isoladas de cães é um achado importante, uma vez que o contato íntimo entre humanos e cães oferece condições para a transmissão das amostras e ainda, que estes animais podem servir de reservatórios de genes de resistência. Esses resultados reforçam a necessidade de controle no uso de antimicrobianos em animais de companhia e bem como o papel dos animais domésticos como reservatório de genes de resistência bacteriana, precisa ser melhor investigado.

The number of cats and dogs has substantially increased in modern society, with an estimated population of above 48 million in Brazil. The relationship between companion animals and humans has radically changed throughout the years, and animals have become in closer contact with humans. As a consequence of these changes, antimicrobial agents, including antimicrobial preparations licensed for human use, are frequently used in dogs. The aim of this study was to investigate, in *Escherichia coli* strains isolated from dogs, the occurrence of β -extended-spectrum β -lactamase (ESBL) phenotype and to identify resistance genes in these samples. The presence and diversity of integrons in strains of *E. coli* was analyzed. The classification of microorganisms in the phylogenetic groups A, B1, B2 and D was also determined. Among 158 *E. coli* strains isolated from dogs (51 from UTI [urinary tract infection], 52 from piometra and 55 from faeces of healthy dogs) 67 strains were selected that had at least one sign of resistance to β -lactams. The strains selected: 41 isolated from UTI, 20 isolated from piometra and six isolated from the faeces of healthy dogs, were tested for antibiotic sensitivity by the disk diffusion method. ESBL production was screened by the double-disk synergy method. The identification of β -lactamases was performed by PCR (Polymerase Chain Reaction) using specific primers for *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES-1}, *bla*_{OXA-10}, *ampC* and *cmx* and, subsequently, sequencing of the PCR product of strains showing the ESBL phenotype was performed. The phylogenetic classification (*chuA*, *yjaA*, TspE4.C2), as well as the detection of class 1 and class 2 integrons, were also determined by PCR. The results of susceptibility tests showed high resistance to 1st generation β -lactams, ampicillin (82.0%) and cephalexin (62.7%), among the selected strains. Resistance to 3rd and 4th generation β -lactam antibiotics and monobactam was observed in 7.5% of isolates. The strains also showed resistance to antimicrobial tetracycline (82%), trimethoprim-sulfamethoxazole (62.7%), enrofloxacin (35.8%), florfenicol (34.3%) and ciprofloxacin (32.3%). Phenotypic

expression of ESBL was observed in 2 samples (3.3%), both isolated from healthy animals. In the genotypic analysis, were identified the genes, *bla*_{TEM}, (98.5%), *ampC* (95.5%), *bla*_{CTX-M} (35.8%), *bla*_{SHV} (6%) and *cmv* (2.9%); the genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} and *cmv* were shown to be associated with *bla*_{TEM} and *ampC*. By sequencing, it was possible to identify the TEM-1 and CTX-M-2 β -lactamases. In the phylogenetic classification, strains were classified B2 (59.7%), B1 (25.4%) and A (14.9%) groups. Among the 67 strains with resistance markers to β -lactams, the *int* gene was detected in 26.9% of the strains (71.4% of class 1 and 28.6% of Class 2). Moreover, among the 91 samples without a trace of resistance to β -lactams, only 3.3% had integrons, all of class 1. Strains with integrons were more commonly housed in the phylogenetic groups A and B1. The presence of ESBL, resistance genes and integrons in *E. coli* isolated from dogs is an important finding, due to close contact between humans and dogs provides conditions for the transmission of microorganisms and these animals may also serve as reservoirs of isolates harboring resistance genes. These results emphasize the need to control the use of antimicrobials in companion animals and the role of livestock as a reservoir for genes of resistance should be further investigated.

A resistência aos antimicrobianos pode significar que a bactéria é impermeável ao fármaco, ou seja, o antimicrobiano não consegue penetrar na célula bacteriana para atingir seu alvo. Esta característica é conferida pela ausência de receptores na membrana externa de bactérias Gram-negativas.

Por outro lado, a resistência pode ser resultado do acaso, mutações que beneficiam a bactéria, permitindo o seu desenvolvimento na presença do fármaco. Tais mutações ocorrem o tempo todo, mas a pressão seletiva efetivamente seleciona aquelas bactérias que conseguem, por alguma razão, crescer na presença dos antimicrobianos.

I. INTRODUÇÃO

1. Resistência aos antimicrobianos

A primeira referência à resistência bacteriana surgiu na década de 40 com as penicilinas, tendo ressurgido com o advento dos novos antibióticos nos anos 50 e 60. Atualmente, os mecanismos de resistência aos antimicrobianos causam enormes problemas terapêuticos com implicações em saúde pública. As bactérias multirresistentes são causas de grandes preocupações tanto em hospitais quanto em indústrias farmacêuticas, uma vez que causam a maior falha em tratamentos de doenças infecciosas, impondo sérias restrições às opções disponíveis ao tratamento médico. A resistência aos antimicrobianos tem emergido rapidamente nos últimos anos no Brasil e no mundo, gerando a necessidade crescente do conhecimento do perfil de sensibilidade das bactérias que mais frequentemente causam infecções e do modo de disseminação da resistência aos fármacos (Dzidic & Bedkovic, 2003; Livermore & Pearson, 2007).

A capacidade das bactérias se tornarem resistentes aos agentes antimicrobianos constitui importante fator na sua sobrevivência. O uso indevido, intensivo e/ou inadequado desses compostos aumenta a pressão seletiva para os microrganismos resistentes. Como o tempo de duplicação de uma bactéria pode ser apenas de 20 minutos, então em algumas horas podem ser produzidas muitas gerações, proporcionando uma ampla oportunidade para a ocorrência de adaptação evolutiva.

Os genes de resistência variam de acordo com a sua localização, tipo de transferência e ainda a expressão (Trabulsi *et al.*, 2001).

Os genes de resistência aos antimicrobianos localizam-se geralmente no cromossomo bacteriano, ou ainda no plasmídeo bacteriano. Quando o gene está localizado no DNA cromossômico, ele é relativamente estável, enquanto o DNA plasmidial pode se transferido com

facilidade de uma cepa a outra, tanto entre bactérias da mesma espécie, quanto entre espécies distintas. Mais recentemente foram relatados elementos conhecidos como transposon, estes se deslocam de um sítio para outro no genoma afetando a expressão gênica. Os transposons podem transportar porções de plasmídios e ainda podem levar parte do cromossomo de uma bactéria a outra por transferência conjugativa (Dzidik & Bedekovic, 2003; Fluit & Schmitz, 2004).

O mecanismo mais comum pelo qual os genes de resistência são transferidos é a conjugação. Este mecanismo requer contato entre as células para que haja a transferência do gene plasmidial de resistência. Entretanto, para que ocorra a transferência, é necessário que a bactéria tenha um plasmídio conjugativo, denominado plasmídio F. Outros mecanismos de transferência genética são a transdução e a transformação. Na transdução o gene de resistência é transferido de uma bactéria a outra através de bacteriófagos (vírus que infectam células bacterianas), e então é integrado no cromossomo da célula receptora, mecanismo conhecido por ciclo lisogênico. A transformação ocorre quando um DNA de uma bactéria lisada está livre no meio e é capturado por outro microrganismo. O gene de resistência pode se integrar tanto no cromossomo, quanto no plasmídio da célula receptora (Furuya & Lowy, 2006).

Ainda pode ocorrer o tipo de resistência mediada por alguma mutação no DNA bacteriano (mutações pontuais, deleções ou inversões). Este fenômeno torna a bactéria resistente a apenas um antimicrobiano, pois dificilmente a bactéria sofre mutações simultâneas tornando-se resistente a dois ou mais antibacterianos. Já mutações que ocorrem no plasmídio de resistência (fator R) normalmente são múltiplas, tornando a célula bacteriana resistente a dois ou mais antimicrobianos. Isso ocorre porque os genes de resistência estão presentes em um único plasmídio. Bactérias com esse perfil de resistência são comuns em hospitais, onde há um uso intenso de antibióticos (Dzidik & Bedekovic, 2003).

As células bacterianas podem expressar os genes de resistência na presença ou não de algum estímulo. A expressão constitutiva ocorre independente de estímulo, a indutiva só é expressa após a exposição e a constitutiva-indutiva é super-expressa após um determinado estímulo (Koneman *et al.*, 2001).

São reconhecidos vários mecanismos que podem levar as células bacterianas se tornarem resistentes: i) expulsão do antimicrobiano da célula (bomba de efluxo); ii) diminuição da permeabilidade do antibacteriano; iii) produção de enzimas que modificam a molécula do antibacteriano tornando-o inativo (ex. produção de β -lactamase); iv) síntese de novas enzimas que não sofrem ação do antimicrobiano e v) alteração do alvo (Trabulsi, 2001).

2. Antimicrobianos β -lactâmicos

Os antimicrobianos β -lactâmicos pertencem ao maior grupo de antibacterianos e são relativamente desprovidos de efeito tóxico direto. Esses compostos interferem na síntese de parede celular bacteriana, tendo o efeito bactericida final, agindo na transpeptidação da molécula de peptídeoglicano.

A estrutura molecular dos antimicrobianos β -lactâmicos é composta por um anel β -lactâmico central, responsável pela ação do antimicrobiano. Acrescentado ao anel β -lactâmico outros substituintes formam os principais grupos, que são as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenens (Forbes *et al.*, 1998).

2.1. Transporte dos compostos β -lactâmicos

É necessário considerar as diferenças entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas para o transporte de moléculas ao sítio ativo. As bactérias Gram-positivas possuem espessa parede celular composta por aproximadamente 90% de peptidoglicano, enquanto nas Gram-

negativas a parede é mais complexa, apresentando uma membrana plasmática interna e uma membrana externa, entre as quais existe uma delgada camada de peptídeoglicano (Koneman *et al.*, 2001)

Nas bactérias Gram-positivas não há necessidade que os compostos β -lactâmicos atravessem a membrana plasmática. O antimicrobiano atravessa facilmente a camada de peptídeoglicano exercendo o efeito bactericida agindo junto às transpeptidases na formação da parede celular (Koneman *et al.*, 2001).

A permeabilidade e o transporte de antibióticos em bactérias Gram-negativas tornam-se mais difíceis, visto que elas possuem duas membranas que servem de obstáculos para os agentes antimicrobianos, cujo alvo de ação encontra-se no interior das células. Até substâncias hidrofóbicas encontram dificuldades para entrar na célula bacteriana, isso ocorre devido à membrana celular externa ter natureza polarizada e assimétrica. Então, para que os compostos β -lactâmicos sejam transportados através da membrana externa da bactéria, é necessário que o mesmo seja realizado por proteínas denominadas porinas. Esse transporte é realizado por duas porinas principais, uma porina de canal amplo, chamada de OmpF (proteína F da membrana externa) e uma porina de canal pequeno, designada OmpC (Koneman *et al.*, 2001).

2.2. Mecanismo de Ação

Para melhor compreensão do mecanismo de ação dos compostos β -lactâmicos é necessário uma breve descrição da síntese da parede celular. Essa ocorre em três etapas iniciando no citoplasma, seguindo na membrana citoplasmática e finalizando externamente à membrana.

Na primeira etapa, são sintetizados no citoplasma ácido murâmico e acetilglicosamina. Na segunda etapa, as moléculas produzidas anteriormente são transportadas para uma camada da membrana citoplasmática e seguindo assim para a superfície externa da célula. A camada lipídica

permite o transporte das subunidades através do interior hidrofóbico da membrana citoplasmática (Koneman *et al.*, 2001).

Na terceira e última etapa ocorre a transpeptidação e as ligações glicosídicas da molécula de peptídeoglicano. Essa nova molécula formada é ligada ao peptídeoglicano pré-existente através de reações de transpeptidases e transglicosidades mediadas pela autolisina (PBP, proteínas fixadoras de penicilinas), a qual é responsável pela abertura de espaços no peptídeoglicano, onde são adicionadas novas moléculas de N-ácido murâmico e N-acetilglicosamina.

Então todos os compostos β -lactâmicos inibem a síntese de peptídeoglicano na terceira etapa da formação da parede celular bacteriana. Após a fixação a sítios de ligação na bactéria (conhecido como sítio de ligação da penicilina, das quais pode haver sete ou mais tipos em diferentes microrganismos), os antibióticos β -lactâmicos inibem a enzima de transpeptidação que forma ligações cruzadas das cadeias peptídicas ligadas ao arcabouço do peptídeoglicano (Koneman *et al.*, 2001).

3. Enzimas β -lactamases

A β -lactamase é, por definição, uma enzima que é capaz de hidrolisar o anel β -lactâmico e com isso inativar as penicilinas e cefalosporinas.

A síntese dessa enzima pode ser cromossômica (constitutiva), ex. *Pseudomonas aeruginosa*, ou mediada por plasmídio (indutiva), ex. *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* (Samaha-Kfouty & Araj, 2003).

A primeira β -lactamase mediada por plasmídio, em um microrganismo Gram-negativo, descrita na década de 1960 foi denominada TEM-1. Essa enzima foi originalmente encontrada em uma cepa de *Escherichia coli* isolada do sangue de uma paciente chamada Temoniera, na

Grécia, daí o nome TEM. Ela foi reportada também na década de 60 em *Salmonella paratyphi* logo após a introdução da ampicilina no tratamento de infecções causadas por estes microrganismos. Devido a localização plasmidial e/ou transposons, facilitou com que o gene *bla*_{TEM-1} fosse transferido a outras cepas bacterianas. Dentro de poucos anos após o primeiro relato, a TEM-1 foi disseminada por todo o mundo e agora é encontrada em diferentes cepas bacterianas como da família das *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (Bradford, 2001; Samaha-Kfoury & Araj, 2003).

Essa proteína ainda, a β -lactamase, possui origem evolutiva comum com as proteínas fixadoras de penicilinas (PBP). As duas necessitam de interação com os compostos β -lactâmicos para exercerem a suas funções. As PBP ainda possuem certa similaridade na sequência de aminoácidos com alguns tipos de β -lactamases. E além disso, foram comprovadas semelhanças na conformação e na estrutura tridimensional das PBP. O mecanismo de ação tanto das PBP quanto das β -lactamases baseia-se na ruptura da ligação amida por acilação enzimática. A sensibilidade bacteriana ao antimicrobiano é determinada pela especificidade das PBP para os antibióticos β -lactâmicos e a especificidade da β -lactamase para um antibiótico β -lactâmico é um determinante da eficácia com a qual a enzima hidrolisa o antibiótico. Dessa forma se ocorrer uma mutação pontual em um ou mais aminoácidos na proteína, pode acarretar a inespecificidade da molécula (Koneman *et al.*, 2001).

Acredita-se que a função fisiológica da enzima β -lactamase é reestruturar o peptídeoglicano durante o crescimento da célula bacteriana (Koneman *et al.*, 2001).

3.1. Classificação

Desde 1970, muitos critérios têm sido utilizados para a classificação funcional e molecular das β -lactamases. O primeiro esquema foi proposto por Rickmond e Sykes em 1973,

baseado nas características fenotípicas do substrato das enzimas, susceptibilidade aos inibidores, ponto isoelétrico, tamanho molecular, localização do gene e identidade imunológica. Assim, as β -lactamases foram divididas em cinco grandes grupos (I-V) [Rickmond & Sykes, 1973]. Ambler, em 1980, sugeriu o esquema de classificação molecular, baseado na sequência de nucleotídeos e aminoácidos dessas enzimas. Então foram propostos as classes A, B, C e D. A classe mais importante é a Classe A, formada por serina proteases que têm afinidade pela penicilina ou atividade de amplo espectro. As enzimas da Classe C são, geralmente, as cefalosporinases, encontradas em bactérias Gram-negativas. As enzimas das Classes B (metaloenzimas) e Classe D (oxacilinasas) têm menor importância clínica (Ambler, 1980). Em 1995, foi desenvolvido um esquema de classificação por Bush, Jacoby e Medeiros baseado nas características funcionais e moleculares. Então as β -lactamases foram divididas em quatro grandes grupos (1-4), sendo que o grupo 2 foi subdividido em seis subgrupos (be, br, c-f) (Bush *et al.*, 1995).

3.2. Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL)

As β -lactamases de espectro estendido são enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefalosporinas de 3^a geração) e monobactam, e são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam e/ou tazobactam. Essas enzimas pertencem à classe molecular A ou D (segundo classificação de Ambler) ou das classes 2be ou 2d (segundo classificação de Bush-Jacoby-Medeiros) [Stürenburg & Mack, 2003; Pfaller & Segratti, 2006].

A primeira ESBL foi observada em cepa de *Klebsiella ozaenae* isolada na Alemanha na década de 80 e essa foi denominada SHV-2, devido ser uma mutação do SHV-1. A partir de então, muitas ESBL foram encontradas por todo o mundo e em muitas espécies bacterianas (Shah *et al.*, 2004, Perez *et al.*, 2007).

Mutações pontuais nos genes *bla_{SHV}* (SHV-1) e *bla_{TEM}* (TEM-1 e TEM-2) levaram então à ocorrência da enzima ESBL. Essa é codificada por um grande plasmídio (mais que 100kb), podendo assim, esse gene ser transferido para outras bactérias da mesma espécie ou mesmo de espécies distintas (Stürenburg & Mack *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2004; Babic *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2007).

O número de variantes identificados de ESBL vem crescendo constantemente desde 1983, demonstrando assim a rápida evolução dessa enzima. Mais de 300 variantes de ESBL são conhecidas até o momento, entretanto essa lista está bem longe de estar completa. Essas enzimas são classificadas em nove famílias distintas baseadas na sequência de aminoácidos (famílias TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES e OXA). As maiores famílias são formadas pelas enzimas TEM e SHV, as quais incluem as primeiras variantes identificadas das ESBLs (Bradford, 2001; Gniadkowski, 2001; Peterson & Bonomo, 2005).

De forma geral, as ESBLs podem ser encontradas em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (Gniadkowski, 2001; Pfaler & Segreti, 2006).

3.3. Grupo das β -lactamases

As enzimas β -lactamases são decorrentes de uma ou mais mutações pontuais nas enzimas pré-existentes. Elas diferem das enzimas originais por 1 a 7 substituições de aminoácidos que alteram a configuração e as propriedades do sítio ativo. As substituições mais importantes ocorrem na posição 164 das TEMs, 179 das SHVs e 238 em ambas (Bradford, 2001).

Já foram descritas mais de 700 β -lactamases, das quais mais de 300 são ESBL. A maioria das ESBLs é derivada das β -lactamases dos tipos TEM e SHV, embora as ESBL possam ser encontradas em outras famílias como CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES e OXA. As β -

lactamases são agrupadas e denominadas de acordo com a similaridade com enzimas já existentes e/ou com grupos já conhecidos (Bush & Jacoby, 2003; Peterson & Bonomo, 2005; Perez *et al.*, 2007).

3.3.1. Grupo TEM β -lactamase

As ESBLs do tipo TEM são derivadas da TEM-1 e TEM-2. A TEM-1 foi reportada pela primeira vez em uma cepa de *E. coli* isolada de uma paciente chamada Temoniera, na Grécia. A enzima TEM-1 é a mais comumente encontrada em bactérias Gram-negativas. Mais de 90% das *E. coli* resistentes a ampicilina produzem TEM-1. Essa enzima também é responsável pela resistência à ampicilina e à penicilina em *H. influenzae* e *N. gonorrhoeae*. O gene *bla*_{TEM-1} está localizado no transposon Tn3 e por isso ocorre uma série de transposições e rearranjos nesse gene e, ainda, é possível que haja a migração desse gene para outras cepas bacterianas (Sanguinetti *et al.*, 2004; Stünrenburg & Mack, 2003; Peterson & Bonomo, 2005) .

Embora as β -lactamases do tipo TEM sejam mais frequentes em *E. coli* e *K. pneumoniae*, essa enzima pode ser encontrada em outras bactérias da família *Enterobacteriaceae*, bem como *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella* spp. (Peterson & Bonomo, 2005) .

A enzima TEM-2 foi a primeira derivada da TEM-1, ocorrendo a substituição de um aminoácido que mesmo causando a alteração no ponto isoelétrico, de 5.1 para 5.6, não ocorreu a alteração no perfil do substrato (Bradford, 2001).

Nos dias atuais, são conhecidas mais de 100 variantes de TEM que expressam o fenótipo ESBL. A primeira variante conhecida foi a TEM-3, a qual foi reportada em 1989. Desde então, tem ocorrido o aumento no número dessas variantes (Bradford, 2001; Stürenburg & Mack, 2003).

A substituição de aminoácidos que ocorre na enzima TEM acontece de forma limitada. Entretanto, essas combinações resultam em várias alterações fenotípicas nas ESBLs, como a habilidade de hidrolisar especificamente oximino-cefalosporina, tais como ceftazidima e cefotaxima, ou ainda alterar pontos isoelétricos de 5.2 para 6.5. Alguns resíduos de aminoácidos são importantes para a produção do fenótipo ESBL quando ocorrem substituições em determinadas posições específicas, como por exemplo: glutamato por lisina na posição 104, arginina por serina ou histidina na posição 164, glicina por serina na posição 238 e glutamato por lisina na posição 240 (Bradford, 2001).

O grupo das TEM β -lactamases é resistente ao ácido cluvânico, sulbactam e tazobactam, isso ocorre independentemente do fenótipo ESBL (Stürenburg & Mack, 2003).

3.3.2. Grupo SHV β -lactamase

A enzima SHV β -lactamase é encontrada mais comumente em cepas de *K. pneumoniae* e é responsável por mais de 20% da resistência à ampicilina nessa espécie. Entretanto, pode ser encontrada em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, em *P. aeruginosa*, *Citrobacter diversus* e *Acinetobacter* spp. Esse grupo é o que expressa mais frequentemente o fenótipo ESBL, com exceção da SHV-4, SHV-10 e SHV-11, que possuem fenótipo de resistência a inibidores de β -lactamase (Bradford, 2001; Stürenburg & Mack, 2003; Shah *et al.*, 2004; Peterson & Bonomo, 2005).

Em muitas cepas de *K. pneumoniae* o gene *bla*_{SHV-1} ou seu aparente precursor, LEN-1, reside no cromossomo. Mais tarde, o gene de SHV-1 foi incorporado por um plasmídio e disseminado entre outras cepas bacterianas. A SHV-1 confere a bactéria resistência a um amplo espectro de penicilinas, tais como a ampicilina, ticarcilina e piperacilina (Bradford, 2001).

Em 1983, foi isolada na Alemanha uma cepa de *K. ozaenae* que apresentou resistência a cefotaxima, bem como às outras cefalosporinas. Essa nova variante foi chamada de β -lactamase SHV-2, derivada da mutação da SHV-1. Essa mutação alterou a posição 238 do aminoácido glicina para serina (Peterson & Bonomo, 2005).

A maior parte das variantes da SHV, que possuem o fenótipo ESBL, é caracterizada por uma substituição de uma serina por uma glicina na posição 238 (Gli238Ser). Pode ocorrer também a substituição de uma lisina por um glutamato na posição 240 (Glu240Lis). O interessante é que ambas as substituições são espelhadas às ESBL do tipo TEM β -lactamase. O resíduo de serina na posição 238 é eficiente na hidrólise de ceftazidima e, o resíduo de lisina é eficiente na hidrólise de cefotaxima (Bradford, 2001; Stürenburg & Mack, 2003).

3.3.3. Grupo CTX-M β -lactamase

Entre os mais novos grupos de β -lactamases está o grupo das CTX-M, que hidrolisam preferencialmente a cefotaxima. É encontrado principalmente em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium e em *E. coli*, entretanto tem sido descrita a ocorrência em outras cepas da família das *Enterobacteriaceae*. Além disso, outra característica fenotípica única da CTX-M é que essa enzima é inibida mais efetivamente pelo tazobactam que pelo sulbactam e ácido clavulânico (Bush & Jacoby, 2003; Peterson & Bonomo, 2005; Celenza *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2007).

A primeira CTX-M β -lactamase foi isolada na Alemanha em 1989, desde então foi disseminada rapidamente por diferentes espécies bacterianas da família das *Enterobacteriaceae*. Até o momento foram descritas mais de 60 variantes neste grupo (Stürenburg & Mack, 2003; Perez *et al.*, 2007).

O grupo CTX-M β -lactamase hidrolisa eficazmente cefalotina e cefaloridina e, menos eficazmente a bezilpenicilina. Embora essa enzima tenha a capacidade de hidrolisar a

ceftazidima, tal ação não é suficiente para promover resistência, que tenha importância clínica, ao microrganismo em que se encontram (Shah *et al.*, 2004; Peterson & Bonomo, 2005).

Este grupo de β -lactamases apresenta somente 40% ou menos de similaridade com grupo das TEM e SHV. Provavelmente a CTX-M foi originada de transferência horizontal de gene e uma posterior mutação da enzima cromossômica, a AmpC, da bactéria *Kluyvera ascorbata*, visto que elas apresentam 99% de similaridade (Bradford, 2001; Stürenburg & Mack, 2003).

O resíduo do aminoácido serina na posição 237 está presente em todas as CTX-M e desempenha importante papel na atividade de amplo-espectro. O resíduo de arginina na posição 276, em posição equivalente a arginina na posição 244 nas ESBL do grupo TEM e SHV, como sugerido em um modelo molecular, pode ter também um papel importante na hidrólise das oximino-cefalosporinas (Bradford, 2001; Stürenburg & Mack, 2003; Peterson & Bonomo, 2007).

As amostras que expressam a β -lactamases CTX-M têm sido isoladas em todas as partes do mundo. Entretanto tem sido associadas mais frequentemente a surtos em locais isolados como o leste da Europa, América do Sul e no Japão (Bradford, 2001).

3.3.4. Grupo OXA β -lactamase

As OXA β -lactamases são nomeadas dessa forma visto que hidrolisam efetivamente a oxacilina. Essa enzima difere das TEM e SHV por pertencerem ao grupo molecular D de Ambler (oxicilinas) e ao grupo funcional 2d de Bush, além de serem mais frequentemente encontradas em *Pseudomonas aeruginosa* (Bradford, 2001; Shah *et al.*, 2004; Pfaller & Segreti, 2006).

Essa enzima confere resistência a ampicilina e cefalotina e é caracterizada por alta atividade hidrolítica contra oxacilina, cloxacilina e meticilina, e é fracamente inibida pelo ácido cluvulânico, exceto a OXA-18 (Bradford, 2001).

O gene *bla*_{OXA} é codificado em plasmídios, transposon ou integron, dessa forma, apresenta fácil disseminação entre outras cepas bacterianas (Bradford, 2001; Stürenburg & Mack, 2003).

A maioria das OXAs é derivada da OXA-10 por mutações pontuais (OXA- 11, 13, 14, 16, 17, 19, 28 e 35), por exemplo: OXA-14 difere da OXA-10 por somente um aminoácido, a OXA-11 e OXA-14 por dois aminoácidos e a OXA-13 e OXA-19 por nove aminoácidos (Bradford, 2001; Stürenburg & Mack, 2003).

3.3.5. Grupos raros de β -lactamases

Enquanto a maioria dos isolados clínicos de β -lactamases pertence aos grupos TEM, SHV e CTX-M, outros grupos que não são relacionados estas três β -lactamases merecem destaque, a saber: SFO, BES, BEL, TLA, GES, PER e VEB (Tabela 1) e não são simples derivados de outras β -lactamases por mutação de ponto. Essas β -lactamases são notáveis pela diversidade geográfica em que são distribuídas (Naas *et al.*, 2008).

Numerosas β -lactamases têm sido descritas mundialmente e é provável que muitas outras sejam descritas no futuro. Essas enzimas podem representar ameaças em potencial, uma vez que esses genes podem estar associados à plasmídios e a integrons, aumentando, assim a chance de disseminação. Muitos desses genes já foram disseminados com sucesso, como no caso do *bla*_{CTX-M}. Outros como SFO-1, BES-1, BEL-1, TLA-1 e TLA-2 ainda são raros e estão geograficamente localizados, enquanto outros como GES, PER e VEB, já foram descritos em vários países. Em muitos casos, estudos epidemiológicos ainda não foram realizados para determinar com precisão a distribuição desses genes. Identificação e conhecimento da ocorrência dessas β -lactamases podem refletir o interesse das equipes de pesquisadores do que a real prevalência. Com as β -

lactamases, mais especificamente as ESBLs, o ditado “só encontramos o que estamos pesquisando” é muito apropriado (Naas *et al.*, 2008).

Outro aspecto preocupante, é que algumas dessas enzimas, por uma simples mutação de ponto, podem ampliar seu espectro de hidrólise para carbapenêmicos, como ocorre com a enzima GES-2. Além disso, o número mutação de pontos que derivadas da variante GES e sua dispersão geográfica sinaliza preocupante evolução na família dessas enzimas (Naas *et al.*, 2008).

Diferente dos genes que codificam as enzimas TEM, SHV e CTX-M, a maioria das β -lactamases pertencente aos menores grupos é codificada em integrons, e ainda podem estar associadas com outros genes de resistência (geralmente genes de resistência a aminoglicosídeos), dessa forma, garantindo a co-resistência, coexpressão e co-seleção de fenótipos de multirresistência. Um exemplo é o que ocorre com o gene *bla*_{VEB-1}, foi observado que este gene está frequentemente associado a plasmídio que codifica resistência a rifampicina e as quinolonas (Girlich *et al.*, 2002; Poirel *et al.*, 2005).

Embora atualmente os menores grupos de β -lactamases sejam raros e restritos geograficamente, eles podem se tornar rapidamente uma grande preocupação, uma vez que as bactérias podem transmitir esses genes de resistência e então disseminar mundialmente (Naas *et al.*, 2006a; Naas *et al.*, 2006b).

Tabela 1. Origem dos nomes das β -lactamases

Nomes das β -lactamases	Ano	Nº de variantes	Origem do nome
" β -lactamases antigas"			
SHV	1983	>100	<u>S</u> ulph <u>h</u> ydryl variable
TEM	1985	>160	Nome de uma paciente: <u>T</u> emoniera
"Novas β -lactamases"			
CTX-M	1989	>65	<u>C</u> efot <u>a</u> ximase- <u>M</u> unich
"Menores grupos de β -lactamases"			
SFO-1	1988	1	<u>S</u> erratia <u>f</u> onticola
TLA-1	1991	1	<u>T</u> lahuicas (Tribo indígena)
PER	1991	3	<u>P</u> seudomonas <u>e</u> xtended <u>r</u> esistance
VEB	1996	5	<u>V</u> ietnam <u>e</u> xtended-spectrum <u>b</u> -lactamase (ESBL)
BES-1	1996	1	<u>B</u> razilian <u>E</u> SBL
GES	1998	9	<u>G</u> uyana <u>E</u> SBL
BEL-1	2005	1	<u>B</u> elgium <u>E</u> SBL
TLA-2	2005	1	51% de similaridade na sequência de aminoácidos com TLA-1
OXA ESBLs			
OXA	1991	Mais de 9	Hydrolysis of <u>o</u> xacillin > penicillin

Fonte: Naas *et al.*, 2008.

4. Uso de agentes antimicrobianos em animais

Existem quatro maneiras pelas quais os agentes antimicrobianos são utilizados em animais: terapia, metafilaxia, profilaxia e promotores de crescimento.

O uso terapêutico de agentes antimicrobianos é destinado para o controle de infecções bacterianas. O modo de aplicação do fármaco com fins terapêuticos difere em relação ao grupo de animais. A princípio, cada animal tem que ter tratamento individual e diferenciado ao grupo que se encontra. A terapia individual é comparada com o uso de antimicrobianos em seres humanos. São realizados exames laboratoriais, a fim de identificar o patógeno causador da infecção no animal e também é realizado o teste de sensibilidade microbiana. O antimicrobiano é administrado oralmente ou por via parenteral, somente no animal que apresenta o sinal da

doença. E, também, a dose administrada é apropriada para cada animal e dependendo do estado da doença (Hammerum & Heuer, 2009).

O tratamento individual muitas vezes é impraticável em animais de produção, que são mantidos confinados em grandes grupos. Nestes casos, é dada a preferência para o tratamento do grupo. Geralmente, a intervenção veterinária ocorre quando um único animal do grupo apresenta algum sinal da doença, prevenindo assim outros animais de serem infectados. Esse procedimento é conhecido como metafilaxia. O uso de medicação no grupo de animais pode reduzir o número de animais doentes sintomáticos e/ou de animais mortos, consequentemente reduzindo o custo com tratamentos (Hammerum & Heuer, 2009).

Em contraste, ao uso terapêutico e ao metafilático, a profilaxia é uma medida preventiva que deve ser utilizada com cautela. O uso de antimicrobianos como medida profilática pode ser utilizada tanto em animais individuais como em grupos. Em vacas produtoras de leite, a administração de antimicrobianos, em doses terapêuticas, ao final do período da lactação é utilizada como método profilático contra a mastite, denominado terapia/profilaxia da vaca seca. Em granjas de suínos, a profilaxia com antimicrobiano é realizada quando há o desmame dos leitões e também quando há a mistura de animais de diferentes rebanhos. Nesses casos, os animais não apresentam nenhum sinal da doença, mas por experiência, é esperado que estejam mais susceptíveis às infecções. A profilaxia com antimicrobiano é essencial para leitões, uma vez que doenças respiratórias e entéricas são frequentemente adquiridas quando não há administração de nenhum antimicrobiano, e o montante de fármaco requerido para a terapia ou metafilaxia seriam muito maiores, diminuindo assim a lucratividade do produtor. Todavia, o tratamento profilático pode aumentar a pressão de seleção para bactérias resistentes (Hammerum & Heuer, 2009).

Ainda mais crítico que a metafilaxia e a profilaxia, é o uso de antimicrobianos como “promotores de crescimento” em animais de produção. Os aditivos de rações de animais mais utilizados no Brasil são: Carbadox, Olanquinox, Bacitracina de Zinco, Espiramicina, Virginiamicina e Fosfato de Tilosina. No Brasil, tem sido sugerido que a retirada destas moléculas promotoras de crescimento pode aumentar o custo de produção em valores significativos, comprometendo o poder de compra das famílias de baixa renda na aquisição de alimentos de origem animal (Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, nº 808, de maio de 2004). Entretanto, é importante a proibição da utilização desses compostos, uma vez que podem causar resistência cruzada com antimicrobianos utilizados na rotina médica bem como a vancomicina, teicoplanina, eritromicina, claritromicina e outros.

O uso de agentes antimicrobianos no tratamento de doenças em animais de produção iniciou-se em meados da década de 40, e a introdução de agentes antimicrobianos na alimentação comercial para bovinos, suínos e aves começou por volta de 1950. Logo após, os pesquisadores começaram estudar os possíveis efeitos do uso em longo prazo desses agentes. Na Europa, a preocupação com a disseminação de bactérias resistentes, provindas em larga escala de animais de produção, fez com que a União Europeia suspendesse o uso desses agentes como promotor de crescimento desde Janeiro de 2006. No Brasil, já foram proibidos o uso de clortetraciclina, oxitetraciclina, penicilinas e sulfonamidas sistêmicas para alimentação animal, de acordo com a Portaria Ministerial no 193, de 12 de maio de 1998. Avoparcina está proibida por tempo indeterminado, pela Portaria no 818-SVS/MS, de 16 de outubro de 1998. Embora a retirada dos agentes antimicrobianos para a promoção de crescimento tenha reduzido significativamente a quantidade total usada nos animais, os dados indicam que o consumo de drogas antimicrobianas para a terapia em clínicas veterinárias ainda é considerável. Os agentes antimicrobianos,

atualmente utilizados no tratamento ou na prevenção de infecções bacterianas em animais, são essencialmente os mesmos utilizados por seres humanos (Schwartz *et al.*, 2001).

5. Resistência bacteriana em animais

A resistência bacteriana está intimamente associada com o uso de antimicrobianos (Li *et al.*, 2007). Existe grande preocupação na área médica em relação ao uso de antibióticos como promotores de crescimento e/ou tratamento de infecções bacterianas, visto que podem aumentar a seleção de microrganismos resistentes, e pode causar dificuldades na efetividade dos fármacos, ou mesmo essas bactérias possam ser transmitidas aos humanos (Llyod, 2008).

Entre os diversos antimicrobianos, o grupo dos β -lactâmicos é o mais utilizado no tratamento de doenças infecciosas. Existe uma variedade de antimicrobianos β -lactâmicos disponíveis para uso veterinário. O uso inadequado destes fármacos pode aumentar a pressão seletiva no desenvolvimento de resistência a essa droga. Tem sido cada vez mais observado em bactérias de origem animal a resistência a antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo os β -lactâmicos de espectro-estendido, causando assim, uma grande preocupação para a saúde humana (Li *et al.*, 2007).

O mecanismo de resistência bacteriana é um problema muito complexo, que envolve diferentes espécies bacterianas, mecanismos de resistência variados, transferência e, a presença de reservatórios. Muitos estudos têm demonstrado que antimicrobianos usados em animais de produção contribuem para a seleção de microrganismos resistentes, apresentando assim riscos aos humanos devido à transmissão de bactérias zoonóticas multirresistentes via cadeia alimentar e transferência indireta de genes de resistência do animal para o homem (Guardabassi *et al.*, 2004).

6. Transferência de resistência bacteriana entre animais e humanos

Animais de produção, bem como animais domésticos, podem atuar como reservatórios de bactérias resistentes. A dispersão dessas bactérias pode ocorrer pelo contato direto com a pele, o contato com bactérias da saliva ou fezes, ou ainda por contaminação de alimentos, água ou ar. Quando a bactéria resistente infecta o novo hospedeiro, ela pode colonizar, infectar ou ainda permanecer por um curto período de tempo. Durante esse período, ela pode não somente disseminar seus genes de resistência às bactérias da microbiota, como também receber genes de resistência de outras bactérias (Hammerum & Heuer, 2009).

Evidências na literatura apontam que bactérias resistentes de animais infectam humanos e ainda transferem seus genes de resistência para a microbiota dos indivíduos. Em 1969, Smith estudou a colonização por *E. coli* de origem humana e animal em intestino de seres humanos. Ele concluiu que amostras de *E. coli* de origem animal não são boas colonizadoras quando comparadas a de origem humana (Smith, 1969). Uma década depois foi concluído o oposto. Linhagens de *E. coli* isoladas de galinhas resistentes a antimicrobianos faziam parte da microbiota intestinal de cinco voluntários (humanos) saudáveis. Quatorze amostras de *E. coli* resistentes foram isoladas de uma galinha comercialmente comprada. Cinco dessas amostras foram capazes de colonizar um dos cinco voluntários e, ainda, essas bactérias permaneceram por dez dias na microbiota intestinal (Linton *et al.*, 1977). A dispersão de *E. coli* de origem intestinal de bovinos e suínos foi estudada, mostrando que o microrganismo foi disseminado com sucesso entre os humanos que manipulavam esses animais (Marshall *et al.*, 1981). Recentemente, foi avaliada a ingestão voluntária por humanos saudáveis de uma amostra bacteriana resistente a gentamicina e sulfonamida de origem suína. A amostra colonizou oito de nove voluntários por no mínimo duas semanas sem nenhuma pressão seletiva antimicrobiana. Eles detectaram ainda, a transferência do gene *sul2* para amostras receptoras na microbiota dos voluntários (Trobos *et al.*,

2008). Em estudo realizado na Dinamarca, *E. coli* que eram resistentes a ampicilina, sulfonamida e estreptomicina foram detectadas mais frequentemente entre isolados de seres humanos voluntários que tiveram contato com suínos no sete dias precedentes a coleta, comparado com voluntários que não tiveram nenhum contato com esta espécie animal (Hammerum & Hauer, 2009).

Os mesmos genes de resistência aos antimicrobianos têm sido detectados tanto em animais quanto em seres humanos, indicando a disseminação horizontal. Diferentes modelos animais têm demonstrado que o intestino é um excelente local de transferência horizontal de genes de resistência entre linhagens de *E. coli* (Duval-Iflah *et al.*, 1994; Lich *et al.*, 2003; Hart *et al.*, 2006). Hart *et al.* (2009) estudaram como modelo o intestino de galinhas e camundongos, e detectaram a transferência de genes de resistência à tetraciclina entre *E. coli* de origem animal para *E. coli* de origem humana. Esses estudos demonstram que a transferência de genes de resistência entre animais e humanos é muito provável.

7. Animais domésticos como reservatórios de bactérias resistentes

Cães e gatos representam fontes em potencial para a disseminação de resistência bacteriana, devido ao uso frequente de antimicrobianos nesses animais e o contato próximo com humanos, favorecendo condições para a transmissão direta ou pelo ambiente doméstico (contaminação de alimentos, mobília, etc). A relação entre animais de companhia e humanos tem mudado radicalmente nos últimos anos, esses estão em contato mais próximo com humanos. Enquanto no passado os cães eram mantidos fora de casa, atualmente muitos deles são criados dentro do lar (Guardabassi *et al.*, 2004). O número de cães e gatos tem aumentado substancialmente na sociedade atual, com o número estimado de 48 milhões desses animais no Brasil (ANFAL, 2008).

Nos dias atuais, a atenção com bem estar de animais domésticos tem aumentado, resultando assim no aumento em gastos com cuidados veterinários, prevenção e terapia de doenças infecciosas. Como consequência os antimicrobianos são frequentemente utilizados nesses animais, particularmente em cães, incluindo antimicrobianos usados em tratamento de infecções humanas (IFAH, 2003). Contudo, essa situação pode resultar em prescrições indevidas de antimicrobianos, principalmente em casos de dificuldades em diagnósticos, aumentando assim os riscos de infecções secundárias e seleção de antibióticos empíricos. Além disso, a identificação bacteriana e o teste de sensibilidade não são realizados com frequência, promovendo uso inadequado de antibiótico (Guardabassi *et al.*, 2004).

As classes de antimicrobianos mais utilizados na clínica veterinária de animais de pequeno porte incluem penicilinas, cefalosporinas, macrolídeos, lincosamídeos, ácido fusídico, tetraciclina, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (Watson & Rosin, 2000). E as causas mais comuns para o uso de antimicrobianos em cães e gatos são dermatites, otites externas, infecções respiratórias e infecções no trato urinário (ITU) [Mason & Kietzmann, 1999].

8. Bactérias de origem animal produtoras de β -lactamase

O primeiro relato de ESBL em cepas de *E. coli* isoladas de animais foi descrito em 1988 no Japão. As β -lactamases SHV, TEM e OXA têm sido frequentemente descritas em *E. coli* e *Salmonella* spp. isoladas de animais e de alimentos de origem animal na Espanha, Alemanha, Estados Unidos e Inglaterra (Carattoli, 2008).

Dada a crescente ocorrência de bactérias produtoras de β -lactamases em isolados de animais, o reservatório de resistência a antimicrobianos β -lactâmicos tem se estendido a bactérias de origem animal (Li *et al.*, 2007).

Os animais também podem representar reservatórios de microbiota fecal resistente. Os conhecimentos ainda são incompletos no que se refere à microbiota intestinal humana, mas é sabido que endógenos da microbiota fecal de origem animal podem ser disseminados na cadeia alimentar e, transitoriamente, colonizar o intestino humano. Bactérias resistentes da microbiota intestinal (principalmente *E. coli*) podem ser agentes de infecção de trato urinário subsequente (Carattoli, 2008).

9. Detecção de ESBL em animais de companhia

Existem poucos relatos da ocorrência de ESBL em animais de companhia. O primeiro relato foi no Japão, em 1988, em linhagem de *E. coli* isolada da microbiota de um cão, que já havia sido tratado com antibióticos β -lactâmicos. A bactéria apresentava muitas marcas de resistência, incluindo às cefalosporinas de 3ª geração. A enzima β -lactamase detectada foi a FEC-1, uma variante da AmpC (Matsumoto *et al.*, 1988).

Posteriormente, alguns estudos foram conduzidos a fim de verificar a ocorrência de ESBL em animais de companhia. Na Espanha, Teshanger *et al.* (2000) fizeram o primeiro relato de ocorrência de ESBL em bactérias isoladas de animais de companhia, em *E. coli* isolada da urina de um cão com infecção de urina recorrente, portadora do gene *bla*_{SHV-12}. Ainda na Europa, Carattoli *et al.*, (2004) e Costa *et al.*, (2005), estudaram *E. coli* isoladas de cães e gatos doentes e saudáveis, e também observaram a ocorrência de ESBL em animais de companhia. E nestes animais as enzimas mais comumente encontradas foram TEM, CTX-M e SHV (Costa *et al.*, 2004; Caratolli *et al.*, 2005). E em estudo realizado no Chile, em apenas três meses, foram isoladas 14 amostras de *E. coli* de cães e gatos que apresentavam o fenótipo ESBL, identificando as enzimas CTX-M e TEM como as mais prevalentes (Moreno *et al.*, 2008).

10. Integrans

Os integrans são definidos como elementos genéticos que, por meio de sistema de recombinação sítio-específico, reconhecem e capturam cassetes de genes móveis (Hall & Collis, 1995; Fluit & Schmitz, 2004; Mazel, 2006; Partridge *et al.*, 2009). Os integrans são compostos por três elementos fundamentais: o gene *int* que codifica a enzima integrase que pertence à família das tirosinas-recombinases; o sítio de recombinação primária (*attI*); e um promotor (P_c) que direciona a transcrição dos genes capturados (Hall & Collis, 1995; Mazel, 2006). A integração dos cassetes ocorre na região *downstream* do promotor P_c e do sítio *attI*, permitindo a expressão gênica do cassete. Os cassetes têm normalmente um único gene e uma pequena sequência adicional denominada de *59 base element* (59-be ou *attC*), que funciona como sítio de recombinação específica. Os genes carregados por esses elementos normalmente não possuem um promotor, e uma vez integrados, passam a fazer parte do integron e os genes são expressos pelo promotor *upstream* (Fluit & Schmitz, 2004). O sítio *attC* é uma família de sequências de nucleotídeos, com função de reconhecer os sítios das integrases (Recchia & Hall, 1995).

Os integrans podem ser divididos em dois grandes grupos: os integrans de resistência (RI) e os super-integrans (SI). Os RI carregam, normalmente, cassetes que codificam genes de resistência aos antibióticos ou desinfetantes. Eles podem estar localizados tanto em cromossomo como em plasmídio, podendo ser denominados ainda de integrans móveis. Os grandes integrans localizados no cromossomo, os quais contêm cassetes de genes com funções variadas, pertencem ao grupo dos super-integrans (SI) ou então dos integrans-cromossomal (Fluit & Schmitz, 2004).

10.1. Integrans de resistência

Atualmente, são conhecidas cinco classes de integrans de resistência (1-5). Essas classes têm sido definidas baseadas na sequência de aminoácidos que codificam a enzima integrase, que

apresentam entre 40-58% de similaridade. Todas as cinco classes estão ligadas fisicamente nos elementos móveis de DNA, como as sequências de inserção (ISs), transposons e plasmídios conjugativos, os quais servem de veículos para a transmissão de material genético intra-espécies e inter-espécies. Os integrons de classe 1 estão associados com transposons funcionais e não-funcionais derivados do Tn402 (Brow *et al.*, 1996), e podem ser incorporados em transposons maiores, como o Tn21. Os integrons de classe 2 são exclusivamente associados com derivados do Tn7 (Radstron *et al.*, 1994), e os de classe 3 são provavelmente localizados em transposons inseridos em um plasmídio ainda não caracterizado (Collis *et al.*, 2002; Correia *et al.*, 2003). As outras duas classes de integrons de resistência, os integrons de classe 4 e classe 5, foram identificados pelo envolvimento na resistência do trimetoprim em espécies do gênero *Vibrio* (Hochhut *et al.*, 2001).

10.1.1. Integrons de classe 1

O integron de classe 1 pode ter sido gerado de aquisição de *intI1* e *attI1* de um transposon da família Tn5053 (Strokes *et al.*, 2006; Gilling *et al.*, 2008) que gerou a estrutura relatada de Tn402 (também conhecida de Tn5090). A sequência específica no início do primeiro cassete é referida como 5'-*conserved segment* (5'-CS).

O tipo mais frequentemente identificado de integron de classe 1 contém a região 5'-CS, mas também inclui uma região referida como 3'-CS. Por convenção, o final da região 3'-CS, em particular em integrons de classe 1, é definida como limite de uma região identificável (Toleman *et al.*, 2006). De natureza conservada, a região 5'-CS e parte da região 3'-CS, imediatamente junto à inserção dos cassetes, permite a amplificação dessa “região variável” usando somente um par de *primers* (White *et al.*, 2000). Então, é nessa região que ocorrem as integrações de cassetes

gênicos mediado pelo receptor *attII*. O integron designado In0, não contém nenhum gene inserido na região 5'-CS e 3'-CS, tornando essas regiões adjacentes (Carattoli, 2001).

Os integrons de classe 1 estão associados a uma série de cassetes de resistência, mas a grande maioria contém o gene de resistência *aadA*, que codifica resistência a estreptomicina e espectinomicina. Determinantes de resistência a trimetoprim e sulfametoxazol também são detectados com frequência. Provavelmente devido a combinação dessas duas drogas ainda ser muito utilizada no tratamento de doenças infecciosas (Fluit & Schmitz, 2004). O integron de classe 1 também está associado à resistência a antimicrobianos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, cloranfenicol, rifampicina, eritromicina, fosfomicina, lincomicina e anti-sépticos da família dos compostos de quaternário de amônio. Foram descritos mais de 80 cassetes de genes diferentes em integrons de classe 1, considerando somente aqueles cassetes que diferem por mais de 5% na sequência de nucleotídeos (Mazel, 2006).

Até 1999, existiam poucos estudos descrevendo a epidemiologia do integron de classe 1. Nesses estudos foi possível verificar que essa variante está disseminada por todo o mundo, especialmente em bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Fluit & Schmitz, 1999). Essa área de pesquisa tem se ampliado nos últimos anos e inúmeros estudos têm sido realizados a fim de verificar a distribuição de integrons (Fluit & Schmitz, 2004).

A fonte de integrons em ambientes hospitalares está muito bem estabelecida (Fluit & Schmitz, 2004). Em estudo realizado por Leverstein-van Hall *et al.* (2002) foi demonstrado que a comunidade é reservatório em potencial, visto que 20% dos voluntários eram portadores de bactérias com integron de classe 1. O uso de antibióticos na produção agrícola, por muito tempo, foi considerado um dos fatores significante na seleção de microrganismos resistentes, embora isto tenha sido negado pelos representantes do agronegócio. Muitos estudos identificaram a ocorrência de integrons de classe 1 em bactérias isoladas de bovinos, suínos, aves e peixes (Bass

et al., 1999; Mazel *et al.*, 2000; Sunde & Sorum, 2000; L’Abee-Lund & Sorum, 2001; Sunde & Sorum, 2001; Morabito *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2002). Além disso, essa classe de integrons já foi detectada em cães e animais de jardins zoológicos (Mazel *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2002). Integrons de classe 1 também tem sido detectados em *Pseudomonas* spp. isoladas de alimentos (Schnabel & Jones, 1999). Os integrons não estão limitados a patógenos, bactérias com integrons têm sido encontradas igualmente em amostras ambientais, bem como em amostras isoladas de água de piscicultura, ambientes estuarinos e outras fontes ambientais (Rosser & Young, 1999; Petersen *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2001; Gebreys & Altier, 2002).

10.1.2. Integrons de classe 2

Diferente do integron de classe 1, somente seis cassetes de resistência têm sido associados aos integrons de classe 2 (Biskri & Mazel, 2003; Ramirez *et al.*, 2005). Essa redução na diversidade é provavelmente devido ao fato que o gene que codifica a integrase do integron de classe 2 contém uma mutação *nonsense* no códon 179, desse modo gerando uma proteína não-funcional. A maioria dos genes de *intI2* descritos contem um *stop codon* interno, que torna a IntI2 inativa, mas uma supressão desse *stop codon* ou a ação de recombinação *in trans* com outra integrase, como a de classe 1 (IntI1), tem se mostrado capaz de reconhecer e recombinar com o sítio *attI1* do integron de classe 2 (*attI2*), permitindo assim, a eventual aquisição de novos cassetes (Hansson *et al.*, 2002). O Tn7 possui uma região com cassete cortado conhecido como *orfX* ou *ybeA* e os *primers ybeA* e a região conservada de *intI2* do Tn7 tem sido utilizada para a amplificação da “região variável” dos integrons de classe 2 (White *et al.*, 2001).

A epidemiologia dos integrons de classe 2 é menos conhecida (Fluit & Schmitz, 2004). Nesses integrons, são frequentemente detectados os cassetes de resistência *aadA1*, *dfrA1* e *sat* (White *et al.*, 2001). Essa classe tem sido detectada em isolados de *Acinetobacter* por todo o

mundo e isso também tem ocorrido em *Shigella sonnei* (Ploy *et al.*, 2000, McIver *et al.*, 2002). Os integrons de classe 2 também tem sido detectados em enterobactérias isoladas de infecções de trato urinário (White *et al.*, 2001), mas semelhante ao integron de classe 1, este não está associado somente a patógenos, é igualmente detectado em isolados ambientais e de animais (Goldsteins *et al.*, 2001; White, *et al.*, 2001; Cocchi *et al.*, 2007; Lapierre *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2008; Ozgumus *et al.*, 2009).

10.1.3. Integron de classe 3

Os integrons de classe 3 foram associados aos transposons da família Tn5053 mas com orientação oposta comparado com *intI1* de Tn402, com IRI somente no final do último cassete. O gene *intI3* demonstra 60,9% de similaridade na sequência de aminoácidos com o gene de *intI1* (Arakawa *et al.*, 1995; Collis *et al.*, 2002).

Até hoje, apenas um integron de classe 3 foi descrito, contendo o gene *bla_{IMP}*, que confere resistência a antimicrobianos β -lactâmicos de amplo-espectro, incluindo os carbapenems e parte do gene *aacA4*, previamente identificado no cassete de integrons de classe 1 (Arakawa *et al.*, 1995).

11. Filogenia de *E. coli*

A coleção de referência de *E. coli* (ECOR), é formada por 72 cepas de diversas origens naturais, selecionadas dentre 2600 amostras, e é tida como representante da diversidade genética da espécie. Em 1987, Selander e colaboradores, baseados na habilidade de fermentação em sete açúcares, a mobilidade em ágar, atividade da enzima ornitina-descarboxilase e quanto ao padrão de migração eletroforética de 35 enzimas, determinaram seis grupos de *E. coli*, conhecidos como A, B1, B2, C, D e E. Foi definido que o grupo A compreendia cepas isoladas, em sua grande

maioria, de humanos; o grupo B1 formado por cepas de mamíferos não-primatas; cepas do grupo B2 e D foram isoladas de humanos e outros primatas e no grupo C humanos e mamíferos (Ochman & Selander, 1984).

Boyd & Harlt estudaram a distribuição filogenética de quatro determinantes de virulência (*hly*, *kps*, *pap* e *sfa*). Foi verificado que os quatro determinantes de virulência limitaram-se predominantemente em dois grupos B2 e D com poucas ocorrências em A e B1, concluindo assim que cepas patogênicas pertenceriam aos grupos B2 e D e cepas comensais e patógenos oportunistas pertenciam aos grupos A e B1 (Boyd & Harlt, 1998).

Clemont *et al* (2000) desenvolveram uma técnica para a determinação dos grupos filogenéticos baseada na amplificação por PCR de três sequências: i) *chuA*, gene necessário para o transporte do grupo heme da hemoglobina na *E. coli* enterohemorrágica O157:H7; ii) *yjaA*, um gene inicialmente identificado da *E. coli* K12 com função desconhecida e iii) fragmento anônimo de DNA designado TspE4.C2. Com o resultado da amplificação Clemont e colaboradores estabeleceram uma árvore dicotômica para o agrupamento filogenético A, B1, B2 e D (Clermont *et al.*, 2000).

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Detectar a produção da enzima β -lactamase de espectro-estendido (ESBL) em amostras de *Escherichia coli* isoladas de cães.

2. Objetivos específicos

- Estabelecer o perfil fenotípico de sensibilidade microbiana frente às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, monobactam e outros antimicrobianos não β -lactâmicos;
- Detectar a produção de ESBL no ensaio de aproximação de discos;
- Identificar os genes de resistência a β -lactamases nas amostras que apresentarem resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos.
- Determinar a sequência dos genes das ESBL detectadas.
- Determinar os grupos filogenéticos das cepas resistentes aos antimicrobianos β -lactâmicos.
- Verificar a ocorrência e a variedade de integrons nas amostras isoladas de cães.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras bacterianas

Inicialmente foram estudadas 158 cepas de *E. coli* isoladas de cães, das quais 51 de ITU (infecção do trato urinário), 52 de piometra e 55 de fezes de cães saudáveis. As amostras foram cedidas pelo Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Botucatu. Os perfis de sensibilidade frente aos antimicrobianos indicados para o tratamento dessas infecções e/ou disponíveis comercialmente para o uso na rotina veterinária foram previamente estabelecidos por Siqueira (2006). As drogas utilizadas foram: ampicilina (10µg), cefalexina (30µg), ceftiofur (30µg), ciprofloxacina (5µg), enrofloxacin (5µg), florfenicol (30µg), gentamicina (10µg), norfloxacina (10µg) e sulfametoxazol com trimetoprim (25µg). Do total de 158 amostras, foram selecionadas 67 que apresentavam resistência a pelo menos um dos antibióticos β-lactâmicos (ampicilina, cefalexina, ceftiofur), resultando no estudo de 41 cepas isoladas de cães com ITU, 20 com piometra e seis de fezes cães saudáveis.

2. Teste de sensibilidade microbiana (antibiograma)

As 67 amostras foram submetidas ao teste de sensibilidade microbiana pelo método de difusão de discos em ágar Muller Hinton (Difco) com 5 mm de espessura inoculada com uma suspensão bacteriana ajustada com o padrão 0,5 da escala MacFarland. Os antimicrobianos utilizados foram: ácido nalidíxico (30 µg), amikacina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), estreptomicina (10 µg), kanamicina (30 µg), tetraciclina (30 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg), aztreonam (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefepima (30 µg) e ceftazidima (30 µg) (Laborclin). A leitura dos antibiogramas foi realizada segundo o “*National Committee for Clinical Laboratory Standards*” – NCCLS (NCCLS, 2003) e interpretadas de

acordo com o “*Clinical and Laboratory Standards Institutes*” – CLSI (CLSI, 2006). Como cepa controle para o teste de difusão de disco foi utilizada a *Escherichia coli* ATCC® 25922.

3. Detecção fenotípica de ESBL – Método da aproximação de disco

A detecção da produção de ESBL pelas amostras foi realizada pelo método de aproximação de disco, utilizando o método descrito acima. Os discos com carga padronizada de aztreonam (30 µg) e cefalosporinas de 3ª geração: ceftriaxona (30 µg), cefotaxima (30 µg) e ceftazidima (30 µg), foram dispostos a uma distância de 20mm de discos de amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg) (Laborclin) (NCCLS, 2003). Para controlar a precisão do teste de aproximação de disco foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* ATCC® 51446 que apresenta o fenótipo ESBL.

4. Detecção dos genes de β -lactamases

4.1. Extração de DNA bacteriano

As amostras foram semeadas em Tryptic Soy Agar (TSA) (Oxoid) e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para obtenção de crescimento confluyente. Em seguida, um raspado de cada uma das amostras foi suspenso em 100 µL de água ultra pura estéril. A suspensão bacteriana obtida foi fervida por 10 minutos em banho-maria e centrifugada a 12000 rpm por 3 minutos. Os sobrenadantes destes materiais foram utilizados para a reação de PCR.

4.2. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Para um volume final de 30 µL de reação foram utilizados 3 µL do tampão 10X concentrado, 2,4 µL da solução de MgCl₂ (25 mM), 0,24 µL de uma mistura dos

deoxirribonucleotídeos (0,2 mM), 1 µL de cada um dos *primers* (30 ng), 0,3 µL de *Taq-polimerase* (1,5 U) e água ultra pura esterilizada q.s.p para um volume de 25µl (Tabela 2).

Tabela 2. Protocolo padrão para a PCR.

Reagentes	Volume (µL)	Concentração final
Água deionizada estéril (q.s.p.)	25	-
10X "PCR Buffer" (Fermentas)	3	1 X
25mM "dNTP mixture" (Fermentas)	0,24	0,2mM cada
Iniciador 1	1	-
Iniciador 2	1	-
25mM de MgCl ₂ (Fermentas)	2,4	2,0mM
DNA extraído	5	-
" <i>Taq-DNA polimerase</i> " (1,5) (Fermentas)	0,3	1,5U
TOTAL	30	-

A cada tubo contendo 25µL do *mix* foram adicionados 5µL do DNA previamente extraído. Os tubos foram colocados nos termocicladores GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems/EUA) previamente programados para executar os ciclos de acordo com a temperatura adequada para cada um dos pares de *primers* utilizados (Tabela 3).

Na reação de PCR, foram utilizados *primers* específicos para determinar os grupos de β-lactamases. A sequência dos *primers*, temperatura de anelamento e peso molecular estão descritos na Tabela 3. Foram utilizadas como amostras padrões as cepas FSP232/05 (GES, TEM e SHV), *E. coli* J53-16.06 (CTX-M) e *Pseudomonas aeruginosa* (OXA-10).

Para a reação de PCR com os genes *ampC* e *cmy* não tínhamos amostras controles. Então ao padronizar as reações foram utilizados *pools* com amostras resistentes à β-lactâmicos, uma vez que amostras com esse fenótipo possivelmente tem alguma enzima β-lactamase, dentre elas a AmpC ou *cmy*. Os *pools* que apresentaram produtos de PCR de peso molecular igual ao descrito na literatura foram abertos e a amostra selecionada como padrão para as reações futuras. Para a

confirmação da banda na altura esperada, foi utilizado o programa GEL COMPAR II versão 4.5 (Applied Maths,/Bélgica).

Tabela 3. *Primers* para a determinação dos grupos β -lactamases.

Gene	Sequências (5' - 3')	T°C / Produto (pb)*	Referência
<i>bla</i> _{TEM}	TCGGGGAAATGTCGCG TGCTTAATCAGTGAGGCACC	60 / 972	Cao <i>et al.</i> , 2002
<i>bla</i> _{SHV}	TTATCTCCCTGTTTAGCCACC GATTTGCTGATTTGCTCGG	61 / 795	
<i>bla</i> _{OXA-10}	TTAGGCCTCGCCGAAGCG CTTTGTTTTAGCCACCAATGATG	55 / 988	
<i>bla</i> _{CTX-M}	ATGTGCAGYACCAAGTAARGTKATGGC TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG	55 / 593	Boyd <i>et al.</i> , 2004
<i>bla</i> _{GES-1}	ATGCGCTTCATTCACGCAC CTATTTGTCCGTGCTCAGG	60 / 755	Poirel <i>et al.</i> , 2000
<i>amp</i> ^C	CCCCGCTTATAGAGCAACAA TCAATGGTCGACTTCACACC	60 / 634	Féria <i>et al.</i> , 2002
<i>cmv</i>	GATTCCTTGGACTCTTCAG TAAAACCAGGTTCCCAGATAGC	56 / 1800	Stapleton <i>et al.</i> , 1999

* pb = pares de base

4.3. Eletroforese em Gel de Agarose

Para a visualização dos resultados, 10 μ l do produto da PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% (Promega/EUA) em TAE (Tampão Tris 2 M, Ácido acético 0,04 M, EDTA 0,01 M pH 8,0), acrescido 10% de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol; 25% de ficol). Foi aplicado 100 V (4 V/cm) por 50 minutos. O padrão de peso molecular de 1 kb (Fermentas/EUA) foi utilizado para confirmar o tamanho do *amplicon*. A visualização das bandas foi feita mediante incubação do gel em solução de brometo de etídio (1,5 μ g/mL) por 10 minutos e visualizada em transiluminador de luz UV (GE Healthcare). Para registro, os géis foram fotografados através do sistema ImageMaster VDS (GE Healthcare) e as imagens foram arquivadas em formato Tiff.

5. Filogenia

A classificação filogenética das amostras foi realizada utilizando o esquema proposto por Clermont *et al.*, (2002) em PCR-Multiplex. Foi usado um par de *primers* para cada gene (*chuA* e *yjaA*) ou fragmento de DNA anônimo (TspE4.C2) (Tabela 4). O esquema proposto permitiu a classificação das cepas nos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D.

Tabela 4. *Primers* para a determinação dos grupos filogenéticos.

Gene	Sequências (5' - 3')	T°C / Produto (pb)	Referência
<i>chuA</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	60 / 279	Clermont <i>et al.</i> , 2000
<i>yjaA</i>	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	60 / 211	
TspE4.C2	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	60 / 152	

Como padrões positivos para o gene *chuA* foram utilizadas as cepas J96 e/ou O157:H7; para *yjaA* foram utilizadas as cepas DH5 α , K-12 e/ou C600 e para TsPE4.C2 somente a cepa 2348/69.

6. Ocorrência e diversidade de integrons

As 67 amostras que apresentaram resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos e as 91 amostras restantes da coleção isoladas de cães foram selecionadas para verificar a ocorrência e diversidade de integrons. Foram utilizados os *primers* específicos de acordo com a Tabela 5 para amplificação do gene da integrase de classe 1, 2 e 3 (*intI1*, *intI2* e *intI3*), e para a amplificação da região variável do integron de classe 1 e classe 2, contendo os cassetes de genes, foram utilizados os *primers* 5-CS e 3-CS e o attI2-F e orfX-R, respectivamente.

Tabela 5. *Primers* para a determinação dos integrons.

Gene	Sequências (5' - 3')	T°C / Produto (pb)	Referência
<i>intI1</i>	GGGTACAAGGATCTGGATTTTCG ACATGGGTGTAAATCATCGTC	62 / 483	Mazel <i>et al.</i> , 2000
5'-CS / 3'-CS	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGGACCTGA	60 / V*	Lévesque <i>et al.</i> , 1995
<i>intI2</i>	CACGGATATGCGACAAAAAGGT CGTAGCAAACGAGTGACGAAATG	62 / 788	Mazel <i>et al.</i> , 2000
attII / orfX	GACGCATGCACGATTTGTA GATGCCATCGCAAGTACGAG	60 / V*	Machado <i>et al.</i> , 2005
<i>intI3</i>	AGTGGGTTTTTCTTGTTATCG TGAGCCCCATACCTACAAAGC	62 / 287	Goldstein <i>et al.</i> , 2001

* V = *amplicon* com produto variável.

Não foram utilizadas amostras padrões para os genes *intI1*, *intI2* e *intI3* uma vez que não conseguimos controles para realização deste teste. Então ao padronizar as reações, foram utilizados *pools* de amostras resistentes a aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol e sulfazotrim, visto que esses fenótipos geralmente estão associados a integrons. Os *pools* que apresentaram produtos de PCR de peso molecular igual ao descrito na literatura foram abertos e a amostra selecionada como padrão para as reações futuras. Para a confirmação da banda na altura esperada, foi utilizado o programa GEL COMPAR II versão 4.5 (Applied Maths/Bélgica).

7. Sequenciamento pela técnica de “*cromossomo walking* ou *primer walking*”

7.1. Extração de DNA genômico

As amostras 57, 16C e 31C foram cultivadas em 2mL de caldo LB a 37°C por 24 horas. A extração do DNA das amostras foi realizada de acordo com o Kit “Wizard® Genomic DNA Purification System” (Promega/EUA). O DNA bacteriano foi armazenado a 4°C em água MilliQ estéril. Para quantificar o material, foi utilizado o Espectrofotômetro Genequant II (GE Healthcare) em comprimento de onda de 260-280nm.

Para verificar a integridade do DNA genômico nas amostras estudadas, este material foi aplicado em um gel de agarose 0,7%. A visualização da banda foi feita mediante incubação em solução de brometo de etídio (1,5 µg/mL) por 10 minutos e visualizada em transiluminador de luz UV (GE Healthcare).

7.2. Sequenciamento do gene *bla*_{CTX-M}

7.2.1. Amplificação do gene *bla*_{CTX-M}

O sequenciamento do gene *bla*_{CTX-M} foi realizado em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia da Costa Darini no Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LABEM) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Previamente foi realizada a PCR com *primers* específicos para CTX-M grupo 2 (Figura 1) conforme descrito na Tabela 6. O protocolo da PCR foi realizado de acordo com o item 4.2, entretanto a *Taq-polimerase* utilizada foi a *High Fidelity* (Fermentas) e o DNA utilizado foi extraído de acordo com o item 9.1.

Foram utilizados três pares de *primers* para o sequenciamento, uma vez que utilizando somente o M2 (F) e o M2 (R) não foram obtidos o *start codon* e o *stop codon*. Então, foram utilizados os pares P12 (F) e P12 (R) e o par P15 (F) e P19 (R).

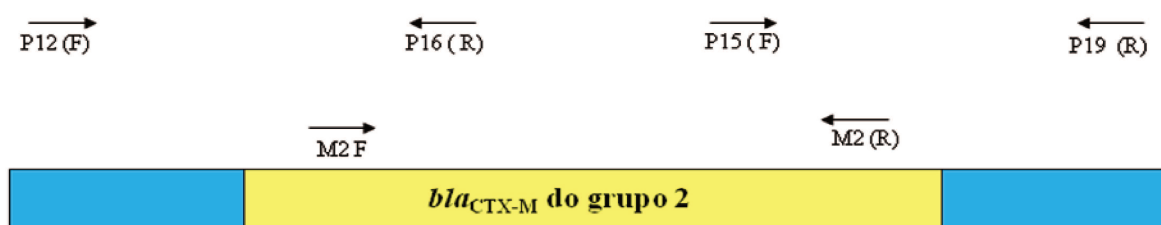


Figura 1. Esquema de amplificação do gene *bla*_{CTX-M} para o sequenciamento.

Tabela 6. *Primers* utilizados no sequenciamento de gene *bla*_{CTX-M}.

Gene	<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	T°C / Produto	Referência
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 2	CTX-M- 2 f	ATGATGACTCAGAGCATTCG	57 / 866	Saladin <i>et al.</i> , 2002
	CTX-M-2 r	TGGGTACGATTTTCGCCGC		
	P12	ACCTTACTGGTACTGCACAT	55 / 632	Clímaco <i>et al.</i> , comunicação pessoal
	P16	CCAAATCGAACCTTATTAGAGC		
	P15	CACAGTTGGTGACGTGGCTTAA	60 / 858	Clímaco <i>et al.</i> , comunicação pessoal
	P19	CCTCCATGATACCGAGTGAGAA		

7.2.2. Reação de sequenciamento do gene *bla*_{CTX-M}

Os produtos da PCR foram primeiramente purificados pela enzima *ExoSAP-IT* (Promega) e utilizados na reação de sequenciamento.

Para cada reação, foram utilizados 5 µL do produto da PCR purificado (200-250ng) e 1µL do *primer* (*forward* ou *reverse*) na mesma concentração utilizada na PCR. Além disso, foram adicionados 4 µL do pré-mix do kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (GE Healthcare) para um volume total de 10 µL de reação de sequenciamento. O programa da reação de sequenciamento foi 30 ciclos: 95°C/20', 50°C/15'', 60°C/1'. Após o término, o material foi precipitado conforme indicações do fabricante e colocado no MegaBace 1000 (GE Healthcare) em sistema capilar.

7.3. Sequenciamento do gene *bla*_{TEM}

7.3.1. Amplificação do gene *bla*_{TEM}

O sequenciamento do gene *bla*_{TEM} foi realizado no laboratório GenDiesel – Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – UNICAMP, sob supervisão do pesquisador Dr. Márcio José da Silva.

Previamente foi realizada a PCR com *primers* específicos para *bla*_{TEM} (Figura 2) conforme descrito na Tabela 7. O protocolo da PCR foi realizado de acordo com o item 4.2,

entretanto a *Taq-polimerase* utilizada foi a *High Fidelity* (Fermentas) e o DNA utilizado foi extraído de acordo com o item 9.1.



Figura 2. Esquema da amplificação do gene *bla*_{TEM} para o sequenciamento.

Tabela 7. Primers utilizados no sequenciamento de gene *bla*_{TEM}.

Gene	Sequências (5' - 3')	T°C / Produto (pb)	Referência
<i>bla</i> _{TEM}	TCGGGGAAATGTCGCG TGCTTAATCAGTGAGGCACC	60 / 972	Cao <i>et al.</i> , 2000
PF2 PR2	TACTTACTCTAGCTTCCCGG CAGTGAGGCACCTATCTCG	60 / 222	Neste trabalho

7.3.2. Reação de sequenciamento do gene *bla*_{TEM}

Os produtos da PCR foram primeiramente purificados pela enzima *ExoSAP-IT* (Promega) e utilizados na reação de sequenciamento.

Para cada reação, foram utilizados 1 µL do produto da PCR purificado (40-50 ng) e 1 µL do *primer* (*forward* ou *reverse*) na mesma concentração utilizada da PCR. Além disso, foram adicionados 4 µL do tampão SM (Tris-HCl 1 M pH 9,0; MgCl₂ 1 M), 1 µL do pré-mix BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit 4336919 (Applied Biosystems – USA) para um volume final de 20 µL de reação de sequenciamento. O programa da reação de sequenciamento foi de um ciclo 96°C/1'30'' e 25 ciclos de 96°C/12'', 50°C/6'', 60°C/4'. Após o término, o material foi purificado conforme indicações do fabricante e colocado no ABI PRISM 3700 DNA Analyzer – Applied Biosystems – HITACHI.

7.4. Montagem dos *contigs* e análise das sequências de nucleotídeos

A montagem dos *contigs* foi realizada pelo doutorando Gustavo Lacerda do laboratório GenDiesel. O programa utilizado foi o Phred (Ewing *et al.*, 2009), Cap3 (Baudet & Dias, 2005). As sequências gênicas obtidas na reação de sequenciamento foram comparadas aos diferentes genes de *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} disponíveis no banco de dados do “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI), através do programa BLAST.

IV. RESULTADOS

1. Perfil de resistência bacteriana

O perfil de resistência das amostras estudadas foi determinado através do antibiograma, realizado pelo método de difusão de disco. As amostras que apresentaram perfil intermediário foram classificadas como resistentes (Machado *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2008).

O maior percentual de resistência foi observado para ampicilina e tetraciclina, com 55 amostras (82%) resistentes frente a cada uma dessas drogas, seguido da cefalexina e sulfametoxazol-trimetoprim, com 42 amostras (62,7%) resistentes a cada uma das drogas e ceftiofur com 36 amostras (53,6%). As amostras do grupo estudado também apresentaram alto índice de resistência às drogas enrofloxacin, florfenicol e ciprofloxacina, com 24 (35,8%), 23 (34,3%) e 21 amostras (32,3%), respectivamente. Com menores percentuais de resistência, seguem as drogas norfloxacin e ácido nalidíxico com 20 amostras (29,8%) resistentes, estreptomicina com 18 amostras (26,8%), gentamicina com 17 amostras (25,4%), cloranfenicol com 16 amostras (23,9%), kanamicina com sete amostras (10,4%) e amikacina com cinco amostras (7,5%) [Tabela 8]. A tabela completa está disponível no Anexo 1.

O perfil de resistência se mostrou diferente frente aos antimicrobianos β -lactâmicos de 3ª e 4ª geração e ao monobactam. Dentre as 67 amostras estudadas, somente cinco (7,5%) apresentaram resistência a pelo menos uma dessas drogas. Sendo que quatro amostras (6%) apresentaram resistência à cefotaxima e ceftazidima, duas (3%) ao aztreonam e ceftriaxona e uma amostra (1,5%) à droga cefepima. O percentual de amostras resistentes ao antimicrobiano + inibidor também foi baixo, somente três amostras (4,5%) apresentaram resistência a amoxicilina-ácido clavulânico (Tabela 8).

Tabela 8. Análise quantitativa do perfil de resistência das amostras de *E. coli* isoladas de cães.

Perfil de resistência ^b	Antibióticos																				
	não - β-lactâmicos												β-lactâmicos								
	AMG ^c				QNL ^d				FI ^e	F ^f		T ^g	P ^h	1 ^a i	3 ^a j				4 ^a l	M ^m	A ⁿ
	AMI	GEN	KAN	STR	NAL	CIP	ENR	NOR	STX	CHL	FLO	TET	AMP	CFX	CTF	CAZ	CRO	CTX	CFP	ATM	AMC
R	5	17	7	18	20	21	24	20	42	16	23	55	55	42	36	4	3	4	1	2	3
S	62	50	60	49	47	46	43	47	25	51	44	12	12	25	31	63	64	63	64	65	64

^b S - Sensível; R - Resistente^c AMG - Aminoglicosídeos; AMI - Amikacina; GEN - Gentamicina; KAN - Kanamicina; STR - Estreptomicina^d QNL - Quinolonas; NAL - Ácido Nalidíxico; CIP - Ciprofloxacino; ENR - Enrofloxacino; NOR - Norfloxacino^e FI - Folato + Inibidor; SXT - Sulfametoxazol + Trimetoprim^f F - Fenicol; CHL - Cloranfenicol; FLO - Florfenicol^g T - Tetraciclina; TET - Tetraciclina^h P - Penicilina; AMP - Ampicilinaⁱ C1^a - Cefalosporina de 1^a Geração; CFX - Cefalexina^j C3^a - Cefalosporinas de 3^a Geração; CFT - Ceftiofur; CAZ - Ceftazidima; CRO - Ceftriaxona; CTX - Cefotaxima^l C4^a - Cefalosporina de 4^a Geração; CFP - Cefepima^m M - Monobactam; ATM - Aztreonamⁿ A - β -lactâmico + inibidor; AMC - Amoxicilina + Ácido Clavulânico

Dentre as amostras que apresentaram resistência às drogas tetraciclina e ampicilina, 17 eram de piometra, 34 de infecção do trato urinário e quatro de animais sadios e 15 de piometra, 34 de infecção do trato urinário e seis de animais sadios, respectivamente. E dentre as amostras que apresentaram resistência a cefalexina e sulfametoxazol-trimetoprim, 13 eram de piometra, 34 de infecção do trato urinário e quatro de animais sadios e 13 de piometra, 24 de infecção de trato urinário e cinco de animais sadios, respectivamente. Entre os antibióticos que apresentaram menor número de amostras resistentes, estas eram de infecção do trato urinário e de animais sadios (Tabela 9). Foi possível observar que as amostras isoladas de infecção do trato urinário apresentaram maior índice de resistência.

Tabela 9. Análise do perfil de resistência dos grupos das amostras de *E.coli* isoladas de cães.

Antibióticos*																					
Grupos de amostras	não - β-lactâmicos												β-lactâmicos								
	AMG				QNL				FI	F		T	P	1 ^a	3 ^a				4 ^a	M	A
	AMI	GEN	KAN	STR	NAL	CIP	ENR	NOR	STX	CHL	FLO	TET	AMP	CFX	CTF	CAZ	CRO	CTX	CFP	ATM	AMC
PIO	2	5	1	4	3	2	3	1	13	2	2	17	15	13	10	0	0	0	0	0	0
ITU	3	10	5	11	15	16	18	16	24	13	21	34	34	25	21	3	2	2	0	2	3
FN	0	2	1	3	2	3	3	3	5	1	0	4	6	4	5	0	2	2	1	0	0

* Antibióticos – ver legenda da Tabela 8.

2. Detecção de ESBL

A produção de ESBL foi considerada positiva quando se observou uma ampliação no halo de inibição com as cefalosporinas ou aztreonam e/ou o aparecimento de uma terceira zona irregular de inibição (*ghost zone*) entre o disco composto (amoxicilina/ác. clavulânico) e o disco de uma das drogas β -lactâmicas (Figura 3). No presente estudo foi verificado que duas amostras (3%) apresentaram o fenótipo ESBL, sendo duas isoladas de cães. As amostras ESBL+ apresentaram multirresistência, o perfil de cada uma delas está descrito na Tabela 9.

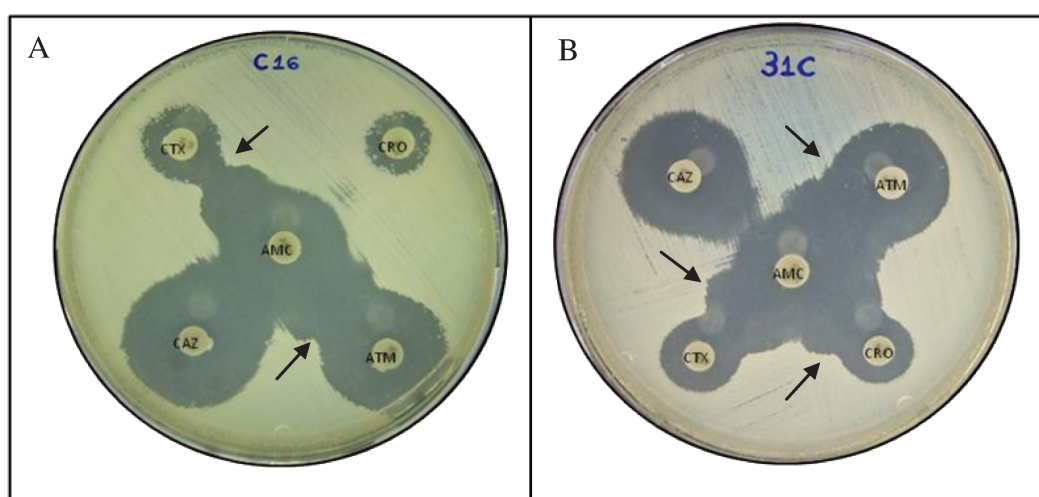


Figura 3. Efeito esperado das amostras ESBL+, as setas indicam a deformação no halo ocorrido pelo efeito do ácido clavulânico. **A.** Amostra 16C. **B.** Amostra 31C.

Tabela 10. Perfil de resistência das amostras de *E. coli* que apresentaram fenótipo ESBL+.

Cepas ^a	Perfil de resistência ^b
16C	AMP CFX CFT CIP ENR GEN NOR STX TET STR CRO CTX CFP
31C	AMP CFX CFT CIP ENR NOR STX TET NAL CRO CTX

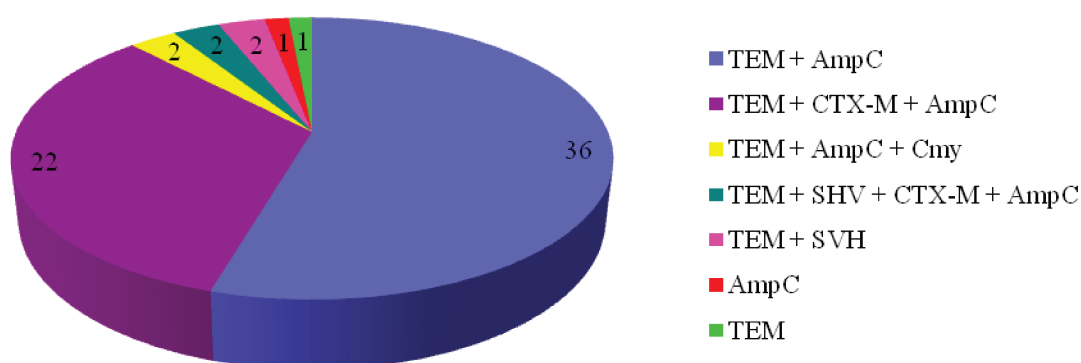
^a isoladas de fezes de animal sadio.

^b Antibióticos – ver legenda da Tabela 8.

3. Detecção dos genes de resistência de β -lactamase

Na análise genotípica realizada pela PCR, observamos que os genes *bla*_{TEM} e *ampC* foram os mais prevalentes, com 66 amostras (98,5%) e 64 amostras (95,5%), respectivamente. O gene *bla*_{CTX-M} foi detectado em 24 amostras (35,8%), o *bla*_{SHV} em quatro amostras (6%) e o *cmv* em duas amostras (2,9%). Nas amostras que apresentaram o fenótipo ESBL, os genes *bla*_{GES-1} e *bla*_{OXA-10} não foram detectados, uma vez que essas variantes têm como características o fenótipo ESBL.

Vale destacar que 65 amostras (97%) apresentam mais de um gene de β -lactamase, sendo que os genótipos mais frequentes foram o *bla*_{TEM} + *ampC* em 36 amostras (53,7%) e o *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} + *ampC* em 22 amostras (29,8%). Os genótipos *bla*_{TEM} + *bla*_{SHV} + *bla*_{CTX-M} + *ampC*, *bla*_{TEM} + *ampC* + *cmv*, e *bla*_{TEM} + *bla*_{SHV} foram presentes somente em duas amostras (2,9%) cada. Os genes *bla*_{TEM} e *ampC* não associados a nenhum outro gene de β -lactamase foram detectados em somente uma amostra (1,5%) cada (Figura 4).

**Figura 4.** Ocorrência dos genes de β -lactamases.

4. Classificação filogenética

Utilizando esquema proposto por Clermont *et al.*, (2002) foi possível classificar as amostras estudadas em três dos quatro grupos existentes. Das 67 amostras estudadas, 40 (59,7%) foram alocadas no grupo B2, 17 (25,4%) no grupo B1 e dez (14,9%) no grupo A. Nenhuma amostra foi classificada no grupo filogenético D.

5. Ocorrência, diversidade e análise de integrons

Inicialmente foi realizada a busca de integrons nas 67 amostras de *E. coli* isoladas de cães que apresentavam resistência aos β -lactâmicos. O gene da integrase (*int*) foi detectado em 18 amostras (26,9%), das quais 12 (66,6%) pertenciam ao grupo de integrons de classe 1 (*int1*) e seis (33,3%) do grupo de integrons de classe 2 (*int2*).

Posteriormente, foi realizada a busca nas 91 amostras da coleção que não apresentavam marcas de resistência a drogas β -lactâmicas. Deste grupo de 91 amostras, somente três (3,3%) apresentaram integrons, sendo que as três pertenciam ao grupo de integrons de classe 1.

Portanto, no conjunto de 158 amostras, com e sem marcas de resistência a drogas β -lactâmicas, 21 (13,3%) amostras apresentaram o gene de integrase (*intI*), sendo que 15 (71,4%) pertenciam ao grupo de integrons de classe 1 e seis (28,6%) ao grupo de integron de classe 2.

Foi observado que no grupo das 21 amostras que apresentaram integrons, todas eram resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim e 19 (90,5%) eram resistentes à tetraciclina. Um número elevado de amostras também apresentou resistência à ampicilina, com 16 amostras (76,2%) resistentes. Dentre as duas amostras que apresentaram o fenótipo ESBL, uma apresentou integron de classe 1.

Das 21 amostras que apresentaram integrons, nove pertenciam ao grupo filogenético B2, nove pertenciam ao grupo B1 e três ao grupo A. Foi observado que os integrons foram mais frequentes em amostras dos grupos filogenéticos não patogênicos (A e B1).

O perfil de resistência das amostras que apresentaram integrons está descrito no Quadro 1.

Na análise da amplificação da região variável do integron de classe 1 (5-CS/3-CS) foi observado que os produtos variaram de 696pb a 1818pb. Em duas amostras não ocorreu a amplificação dessa região, por outro lado, em uma amostra ocorreu a amplificação de duas bandas, uma de 1055pb e a outra de 1500pb.

Analisando a região variável das seis amostras que apresentaram integron de classe 2, observamos que três amostras amplificaram bandas com 2200pb, uma amostra amplificou uma banda com 2258pb, uma com banda de 2173pb e uma com banda de 1953pb.

Quadro 1. Perfil de resistência das amostras com integron de classe 1 e classe 2.

	Amostras	AMP	CFX	CFT	CIP	ENR	FLO	GEN	NOR	STX	AMI	CHL	KAN	TET	NAL	STR	ATM	CAZ	CRO	CTX	CFP	AMC
Classe 1	3																					
	11																					
	17																					
	51																					
	55																					
	57																					
	61																					
	66																					
	67																					
	71																					
	85																					
	87																					
	95																					
	16C																					
	23C																					
Classe 2	1																					
	7																					
	48																					
	56																					
	78																					
	48C																					

AMP = Ampicilina, CFX = Cefalexina, CFT = Ceftiofur, CIP = Ciprofloxacino, ENR = Enrofloxacino, FLO = Florfenicol, GEN = Gentamicina, NOR = Norfloxacino, STX = Sulfametoxazol+Trimetoprim, AMI = Amicacina, CHL = Cloranfenicol, KAN = Kanamicina, TET = Tetraciclina, NAL = Ácido Nalidíxico, STR = Estreptomicina, ATM = Aztreonam, CAZ = Ceftazidima, CRO = Ceftriaxona, CTX = Cefotaxima, CFP = Cefepima, AMC = Amoxicilina + Ácido Clavulânico.

6. Sequenciamento

Para a montagem dos *contigs* foi utilizado o programa Phred (Ewing *et al.*, 2009). Posteriormente foi utilizado o Baudet (Baudet & Dias, 2005) para limpar a sequência e descartar as regiões de baixa qualidade de cada *read*. E, por último, foi utilizado o programa CAP3 (Huang & Madan, 1999) com parâmetros padrão para montar os *reads* de cada amostra. Os principais parâmetros foram: *overlap*, -o, (40bp de *overlap*) e identidade, -p, (80% de identidade). Ou seja, duas sequências são agrupadas em um *contig* somente se elas compartilham ao menos uma região de 40bp 80% idênticas. A montagem dos *contigs* foi realizada por Gustavo Lacerda, do Laboratório de GenDiesel – DGE – UNICAMP.

As sequências gênicas obtidas na reação de sequenciamento foram comparadas aos diferentes genes de *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} armazenados no banco de dados do NCBI utilizando o sistema BLAST. O programa ClustalW foi utilizado para alinhamento das sequências. O software BLASTx é uma ferramenta adequada para identificar proteínas homólogas em uma região codante de nucleotídeos, além de combinar todos os seis *frames* de leitura. A sequência completa dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} das amostras de *E. coli* que apresentaram o fenótipo ESBL estão descritos abaixo.

6.1. Sequenciamento do gene *bla*_{TEM}

Para a leitura da reação de sequenciamento do gene *bla*_{TEM} das amostras 16C, 31C e 57 foi utilizado o sequenciador ABI do Laboratório GenDiesel – Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – UNICAMP, sob supervisão do Dr. Márcio José da Silva.

6.1.1. Amostra 16C

O sequenciamento do gene *bla*_{TEM} da amostra 16C resultou em uma sequência de 1086pb.

Em negrito estão destacados o *start codon* e o *stop codon*.

TTTCTAATACTTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCA
ATAATATTGAAAAAGGAAGAGT**ATG**AGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCC
CTTTTTTGCGGCATTTCCTTCTCTGTTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTA
AAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAAC
AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACT
TTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAA
CTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACA
GAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAAC
CATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGG
AGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAGTTCGCCTTGATCGTTGGG
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGCA
GCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCC
CGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCG
CTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG
GTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGT
TATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTG
AGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT**AACTG**TTCAGAGCAAGAGTAGTCCTATA
TACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCT
TTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGCAG
AAGT

Através da ferramenta Blastn, foi observado que a sequência de nucleotídica da amostra 16C apresentava 100% de similaridade com o gene *bla*_{TEM-1}. Então, foram escolhidas três sequências desse gene já depositadas no GeneBank com números de acesso: FJ405203.1, FJ405208.1, FJ405193.1, para serem analisadas com a amostra 16C pelo programa ClustalW. No Anexo 2 está disponível o alinhamento da amostra através do programa ClustalW.

Comparando a sequência FJ405208.1 com a amostra 16C é possível observar uma alteração de nucleotídeo na posição 21. Entretanto com as outras sequências, não ocorre essa alteração. Analisando a sequência nucleotídica, todas as sequências selecionadas apresentam uma timina na posição 395 e na amostra 16C apresenta uma guanina. Embora tenha ocorrido essa

alteração, não houve alteração na sequência de proteína, uma vez que ocorreu um polimorfismo sinônimo.

A sequência analisada no Blastx, também mostra 100% de similaridade com a enzima TEM-1

6.1.2. Amostra 57 – *bla*_{TEM}

O sequenciamento do gene *bla*_{TEM} da amostra 57 resultou em uma sequência de 1090pb.

Em negrito estão destacados o *start codon* e o *stop codon*.

```
CGATTGTTATTTTCTAATACTTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGGT
AAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTTCGTGTCG
CCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTG
GTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACT
GGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAAT
GATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGG
CAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTCA
CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGC
TGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGG
ACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGA
TCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGA
TGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTC
TAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCA
CTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTG
AGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTA
TCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAG
ATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGGACAAGTTTAC
TCCTATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGA
AGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTG
AGCGC
```

Utilizando a ferramenta Blastn, foi observado que a sequência nucleotídica da amostra 57 apresentava 100% de similaridade com o gene *bla*_{TEM-1}. Então, foram escolhidas três sequências desse gene já depositadas no GeneBank com números de acesso: FJ405203.1, FJ405208.1, FJ405193.1, para serem analisadas com a amostra 57 através do programa ClustalW. No Anexo 3 está disponível o alinhamento da amostra através do programa ClustalW.

Nessa sequência também ocorreu uma alteração de nucleotídeo na posição 18. Nas sequências selecionadas há uma citosina, enquanto na amostra estudada há uma timina. Embora tenha ocorrido essa alteração, não houve a mudança de aminoácido e consequentemente nem alteração na proteína.

Utilizando o Blastx para análise da proteína, a sequência mostra 100% de similaridade com a enzima TEM-1.

A amostra 57, no início dos testes fenotípicos, foi observada que esta apresentava resistência às cefalosporinas de 3^a geração. Entretanto, ela não apresentava o fenótipo ESBL. Então, com o objetivo de analisar uma possível mutação no gene *bla*_{TEM} esta amostra foi sequenciada.

6.1.3. Amostra 31C - *bla*_{TEM}

O sequenciamento do gene *bla*_{TEM} da amostra 31C resultou em uma sequência de 1188pb. Em negrito estão destacados o *start codon* e o *stop codon*.

TATTTTCTAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGC
TTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT**G**AGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTA
TTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCTGTTTTTCTGCTACCCAGAAACGCTGGTGAAA
GTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTC
AACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGC
ACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAG
CAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTC
ACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCAT
AACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGA
AGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTT
GGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCT
GCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCT
TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTG
CGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGT
GGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTA
GTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGC
TGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA**A**ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATA
TATACTTTAGATTGATTTAA**A**ACTTCATTTTTTAATTTAA**A**AGGATCTAGGTGAAGATC
CTTTTTGATAATCTCATGACCAA**A**ATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGT

CAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAAT
CTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGGGGTTTGTG

Utilizando a ferramenta Blastn, foi observado que a sequência de nucleotídica da amostra 31C apresentava 100% de similaridade com o gene *bla*_{TEM-1}. Então, foram escolhidas três sequências desse gene já depositadas no GeneBank com números de acesso: FJ405203.1, FJ405208.1, FJ405193.1, para serem analisadas com a amostra 31C através do programa ClustalW. No Anexo 4 está disponível o alinhamento da amostra através do programa ClustalW.

Na posição 238 a amostra 31C difere das outras sequências depositadas no GeneBank por um nucleotídeo. Na amostra 31C, nessa posição, é encontrada uma timina, enquanto nas outras sequências, nessa mesma posição é encontrado uma citosina. Embora tenha ocorrido esse mudança, não houve alteração na sequência da proteína, uma vez que foi um polimorfismo sinônimo.

Utilizando o Blastx para análise da proteína, a sequência mostra 100% de similaridade com a enzima TEM-1.

6.1.4. Alinhamento do gene *bla*_{TEM-1} das amostras 57, 16C e 31C

A fim de verificar se o gene *bla*_{TEM-1} das três amostras sequenciadas são semelhantes entre si, foi realizado o alinhamento das sequências utilizando o programa ClustalW. O alinhamento está disponível no Anexo 5.

A sequência de nucleotídeos das amostras 16C e 31C são idênticas, já a amostra 57 difere em três nucleotídeos. Na posição 18, as amostras 16C e 31C apresentam uma citosina, enquanto a 57 apresenta uma timina. Na posição 228, as amostras 16C e 31C apresentam novamente uma citosina, enquanto a amostra 57 apresenta uma timina. E por fim, as amostras 16C e 31C apresentam uma guanina na posição 393, e na amostra 57, nessa mesma posição, é observada uma timina. Mas essas alterações nucleotídicas não mudaram os aminoácidos que formam a

proteína, uma vez que ocorreram mutações sinônimas. Para confirmar a similaridade da sequência de proteína, foi realizado o alinhamento no ClustalW. Abaixo segue o resultado.

```

16C_      MSIQHFRVALIPFFAAFCPLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP 60
57_      MSIQHFRVALIPFFAAFCPLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP 60
31C_      MSIQHFRVALIPFFAAFCPLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELDLNSGKILESFRP 60
          *****

16C_      EERFPMNSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL 120
57_      EERFPMNSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL 120
31C_      EERFPMNSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTEKHLTDGMTVREL 120
          *****

16C_      CSAAITMSDNTAANLLLTITGGPKELTAFLHNMGDHVTRLDRWEPPELNEAIPNDERDTTM 180
57_      CSAAITMSDNTAANLLLTITGGPKELTAFLHNMGDHVTRLDRWEPPELNEAIPNDERDTTM 180
31C_      CSAAITMSDNTAANLLLTITGGPKELTAFLHNMGDHVTRLDRWEPPELNEAIPNDERDTTM 180
          *****

16C_      PAAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSAIPAGWFIADKSGAGERG 240
57_      PAAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSAIPAGWFIADKSGAGERG 240
31C_      PAAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSAIPAGWFIADKSGAGERG 240
          *****

16C_      RGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW 286
57_      RGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW 286
31C_      RGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGASLIKHW 286
          *****

```

Legenda: A= Alanina, C= Cisteína, D= Aspartato, E= Glutamato, F= Fenilalanina, G= Glicina, H= Histidina, I= Isoleucina, K= Lisina, L= Leucina, M= Metionina, N= Asparagina, P= Prolina, Q= Glutamina, R= Arginina, S= Serina, T= Treonina, V= Valina, W= Triptofano, Y= Tirosina.

6.2. Sequenciamento do gene *bla*_{CTX-M}

Para a leitura da reação de sequenciamento do gene *bla*_{CTX-M} da amostra 16C e da 31C foi utilizado o sequenciador MegaBace 1000 (GE Health Care) do Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LABEM) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. O sequenciamento dessa amostra foi realizado pelo aluno Leonardo de Andrade sob orientação da Prof^{ra}. Dr^a. Ana Lúcia da Costa Darini.

6.2.1. Amostra 16C

O sequenciamento do gene *bla*_{CTX-M} da amostra 16C resultou em uma sequência de 1813pb. Em negrito estão destacados o *start codon* e o *stop codon*.

TTGCTGACGCAGTAAATTGGGGCTTGAGCGGTAACGAGTGAGGGAATTTTCAGGTAA
 GATACTTCGGATGAGGAGCAAAAAGGTGGTTTATACTTCCTATACCCCTCGCCCTTT
 AAACCTTATTGATTTTATGGCTAATTTTGGCGACAGACGTCAAAAAATTTTGCCGTACC
 TGCGTACCCCTCATCCTTTTTTCCGCTGCTGCAAAATGTGCTGCTCCTTTTCGTGAGCG
 ATCTCTGACTTTTGCTTTTTTCGCCGCGATGTAAACATGGACCAGGCTCAATTGTGGAG
 ATATTGGCAGGTTTTGTTTTTACTTTTTGTTTTTTCAATGTATACTTGAAGGCCGAGGG
 ATAATACTAATAGAGGATTTTAAATGATGACTCAGAGCATTCGCCGCTCAATGTAA
 CGGTGATGGCGACGCTACCCCTGCTATTTAGCAGCGCAACGCTGCATGCGCAGGCGA
 ACAGCGTGCAACAGCAGCTGGAAGCCCTGGAGAAAAGTTCGGGAGGTCGGCTTGGC
 GTTGCGCTGATTAACACCGCCGATAATTCGCAGATTCTCTACCGTGCCGATGAACGT
 TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAAGGTGATGGCGGCCGCGGCCGGTGCTTAAACAGAGC
 GAGAGCGATAAGCACCTGCTAAATCAGCGCGTTGAAATCAAGAAGAGCGACCTGGT
 TAACTACAATCCCATTGCGGAGAAACACGTTAACGGCACGATGACGCTGGCTGAGCT
 TGGCGCAGCGGCGCTGCAGTATAGCGACAATACTGCCATGAATAAGCTGATTGCCCA
 TCTGGGTGGTCCCGATAAAGTGACGGCGTTTGCTCGCTCGTTGGGTGATGAGACCTT
 CCGTCTGGACAGAACCGAGCCCACGCTCAATACCGCCATTCCAGGCGACCCGCGTGTA
 TACCACCACGCCGCTCGCGATGGCGCAGACCCTGAAAAATCTGACGCTGGGTAAAG
 CGCTGGCGGAAACTCAGCGGGCACAGTTGGTGACGTGGCTTAAGGGCAATACTACC
 GGTAGCGCGAGCATTCGGGCGGGTCTGCCGAAATCATGGGTAGTGGGCGATAAAAC
 CGGCAGCGGAGATTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTTATCTGGCCGGAAAACC
 ACGCACCGCTGGTTCTGGTGACCTACTTTACCCAACCGGAGCAGAAGGCGGAAAGCC
 GTCGGGATATTCTGGCTGCGGCGGGCGAAAATCGTAACCCACGGTTTCTGATGCAATA
 AATGGAGCGAGGTATCGCTCCATTTACGTAAAAAATGTGCTCCTGAACCTTCAGTCTT
 GTCTTGCAACGAACCCTCATCTCTTTCTATCATTCCGCTCTTTTTTCTGGACCAAATAT
 CTTAGCTTCAGGAAGGTAATAGATAACAATTTCTTATGTAACTATTTTATTTTAAAT
 AATGTTTAAGGCATTTAATTATTAGGTTGTTTGTTTTTATTGTAATTATCTGATTTACA
 CTTGCAGTATTCCTATTTTTTTTACACTGGAATAATTTCCGGCCTTCCGTATCTCCTTTCT
 GTCTGCATGGTTGTTTTCTAATGGTTTTTTATGCTTTAAGAATTTTATTTATTTTTAAT
 AGTTGAACTAAGAGCCATCTTAAAAGCTTATTGACAATAAATTACCTCAATGAAATT
 ATTCTAATATGGATAAGGAGGGGACAATGAAGTCGCTCAATAATAATTTTGCAAGAG
 TTACCTGTATGAGCTGCCCTTCTCATTGTGAAGTTAAGCCAAATGCCTCTCTACGGTT
 CATTTGTCAGGATACTGTTTTGACCTGCCGAGCGTTCC

Utilizando a ferramenta BLASTn, foi observado que a sequência nucleotídica da amostra 16C apresentou 100% de similaridade com o gene *bla_{CTM-M-2}*. Assim, foram escolhidas três sequências desse gene depositadas: números de acesso FJ815286.1, FJ815264.1 e FJ815249.1 para serem comparadas com a sequência nucleotídica da amostra 16C através do programa ClustalW. No Anexo 6 está disponível o alinhamento da amostra através do programa ClustalW.

A sequência analisada no Blastx também mostrou 100% de similaridade com a CTX-M-2.

V. DISCUSSÃO

A resistência às drogas antimicrobianas é reconhecida como um problema emergente tanto na medicina humana quanto na veterinária e, o seu uso considerado o fator mais importante para essa emergência, para a seleção e disseminação de bactérias resistentes. Também é reconhecido que o uso dos antimicrobianos, com fins profiláticos ou terapêuticos, contribui para a seleção de bactérias resistentes. Portanto é necessária a colaboração de diferentes profissionais na vigilância do uso racional de antibióticos, em todas as vertentes, de forma a controlar esse problema (Witte, 1998; Sayah *et al.*, 2005).

Tem aumentado nos dias de hoje a atenção com o bem estar dos animais domésticos, resultando na prevenção e no tratamento de doenças infecciosas. Como consequência dessas mudanças, o uso de antimicrobianos nesses animais é mais frequente. Na maioria das vezes são utilizadas as mesmas drogas em animais e humanos (Guardabassi *et al.*, 2004). As classes de antimicrobianos mais utilizados na rotina veterinária incluem penicilinas, cefalosporinas, sulfonamidas, aminoglicosídeos e quinolonas (IFAH, 2003). Este fato provavelmente explica o alto número de amostras resistentes a ampicilina (82%), cefalexina (62,7%) e sulfatetoxazol-trimetorpim (62,7%) em nosso trabalho.

Vale destacar o grande número de amostras resistentes à tetraciclina (82%) nos animais estudados. A provável explicação é que este antimicrobiano é um dos mais antigos utilizados na rotina veterinária e o uso contínuo desse fármaco pode ter levado a pressão seletiva de linhagens resistentes (Ribeiro, comunicação pessoal). Atualmente, essa droga é utilizada com restrições em pequenos animais, sendo substituída por fluorquinolonas e também pela doxiciclina. O número elevado de amostras resistentes à tetraciclina, também pode ser explicado pelo fato de que o gene *tet* é frequentemente codificado em plasmídeos conjugativos ou elementos móveis no DNA, o que facilitaria a transferência desse gene entre bactérias. O gene *tet* é descrito em patógenos, bactérias

oportunistas e em bactérias da microbiota, sendo que as bactérias que albergam esse gene foram detectadas tanto em humanos e animais, como também em alimentos e no meio ambiente, favorecendo assim a transferência a outras cepas (Roberts, 1996). Uma hipótese, que deve ser melhor investigada, é que pode ocorrer resistência cruzada entre os fármacos da classe das tetraciclina, uma vez que existem quatro mecanismos de resistência envolvidos e mais de 20 genes descritos (Chopra & Roberts, 2001). Contrariamente aos estudos já realizados, a tetraciclina é uma droga que apresenta o perfil de resistência intermediário, com aproximadamente 20% de amostras resistentes (Hagman & Greko, 2005; Costa *et al.*, 2008; Pedersen *et al.*, 2007). No presente estudo, foi observado 82% de resistência entre as amostras estudadas.

Dentre o grupo de amostras analisadas, também foi possível observar um grande número de amostras resistentes à ampicilina (82%) e sulfametoxazol-trimetoprim (62,7%). Esse resultado era esperado, uma vez que essas drogas são muito utilizadas na rotina veterinária (Siqueira, comunicação pessoal).

As cefalosporinas de 3ª geração (ceftriaxona, ceftazima e cefotaxima), 4ª geração (cefepima) e o monobactam (aztreonam) são utilizadas com mais cautela na rotina veterinária. Este resultado pode ser confirmado em nossos estudos, pois somente cinco amostras (7,5%) apresentaram resistência a pelo menos uma dessas drogas. O contrário aconteceu com o ceftiofur (cefalosporina de 3ª geração), que observamos 53,3% de amostras resistentes. Essa droga foi desenvolvida para o uso em grandes animais, mas recentemente passou a ser utilizada em animais de pequeno porte. Sua grande vantagem é a via de aplicação, subcutânea, uma vez que facilita o uso por via parenteral em certas afecções em cães. A ampicilina também tem aplicação subcutânea, mas tem sido deixada de lado porque se observava grande resistência. Já a cefalexina (também utilizada em rotina veterinária), além de ter de custo mais elevado para o proprietário, é

de uso oral, dificultando a sua administração, principalmente em animais internados, com vômitos, diarreia, além de ser altamente irritante para a mucosa gastrintestinal. Embora existam vantagens na utilização de uma cefalosporina de 3ª geração como primeira escolha no tratamento de doença infecciosa, é necessário que o clínico solicite o teste de sensibilidade microbiana. Dessa forma, aumentaria a efetividade no tratamento e evitaria o uso de antimicrobianos inadequados. Com a prescrição indevida de antimicrobianos, principalmente pela dificuldade no diagnóstico, o risco de infecções secundárias aumenta, além seleção de fármacos empíricos e também a pressão seletiva por bactérias resistentes (Guardabassi *et al.*, 2004). Uma vez resistentes a uma determinada droga, as bactérias podem transferir o gene para outra bactéria. E esse mecanismo é uma preocupação constante na área médica.

O alto índice de resistência entre amostras de infecção de trato urinário é que a terapia dessa doença é fundamentada na utilização de antimicrobianos (Tavares, 2003). E em algumas ocasiões, não há efetividade no tratamento, sendo necessária a utilização de outros fármacos, favorecendo a seleção de microrganismos multirresistentes. E também o animal portador da infecção e de bactérias resistentes muitas vezes está dentro do lar dos seus proprietários e urinando em locais que pode acarretar risco de transmissão. Já nos casos de piometra, indica-se a resolução cirúrgica do processo, não utilizando antimicrobianos no tratamento. Dessa forma, reduz a pressão seletiva para bactérias com resistência múltipla nesse tipo de afecção em cães.

Dado ao crescente número de animais domésticos e a mudança de hábito dos proprietários, esses animais tem sido considerado reservatórios de bactérias multirresistentes com potencial capacidade de disseminação (Guardabassi *et al.*, 2004).

Estima-se que na América Latina 8,5% das *E. coli* apresentam o fenótipo ESBL (Villegas *et al.*, 2008), no Brasil esse número reduz a 0,7% em *E. coli* isoladas da comunidade e 6,2% em *E. coli* isoladas de ambientes hospitalares (Minarini *et al.*, 2007, Dropa *et al.*, 2009). O número

observado na comunidade é inferior ao observado nos cães, uma vez que 3% das amostras resistentes aos β -lactâmicos de *E. coli* isoladas de cães apresentaram o fenótipo ESBL. Por Nossos resultados também foram inferiores aos encontrados em cães na Itália e Portugal, que detectaram a presença de ESBL 6,7% e 6,6%, respectivamente (Costa *et al.*, 2004; Caratolli *et al.*, 2005). A ocorrência de ESBL em amostras isoladas de animais de companhia sinaliza para a necessidade de melhor controle na utilização de antimicrobianos. Os animais de companhia estão em contato próximo com seus proprietários, possibilitando a transmissão cruzada de bactérias. Em um primeiro momento pode não ocorrer doença, mas as bactérias podem transferir os genes de resistência para as bactérias da microbiota do novo hospedeiro.

No Brasil os grupos das β -lactamases descritos em maior frequência em isolados clínicos em humanos são *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} (Minarini *et al.*, 2007; Minarini *et al.*, 2008). Entretanto, não há estudos que demonstrem a ocorrência em amostras de *E. coli* de origem animal.

Estudos realizados na Espanha, no Japão e na Dinamarca em *E. coli* isoladas de animais de produção (bovinos, frangos e suínos), revelaram que a maior ocorrência é da β -lactamase do tipo CTX-M, seguidas das β -lactamases do tipo TEM e SHV (Briñas *et al.*, 2003; AAerstrup *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2008). Os resultados são condizentes com aqueles observados em bactérias isoladas de animais de companhia, na Europa, mais precisamente na Espanha, Portugal e Itália, onde estudos foram conduzidos a fim de verificar a ocorrência de β -lactamases nesses animais, demonstrando que as β -lactamases do tipo TEM, SHV e CTX-M também são as mais frequentes em animais (Teshager *et al.*, 2000; Feria *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2004; Caratolli *et al.*, 2005). Esses achados estão em consonância com os obtidos no presente estudo, visto que β -lactamases TEM, SHV e CTX-M e a β -lactamase AmpC foram as mais comumente detectadas nos cães amostrados.

O gene *cmv* confere à bactéria resistência às cefalosporinas de amplo-espectro. Entretanto é necessário esclarecer que essa enzima não deve ser considerada como ESBL (Phillipon *et al.*, 2002). Na nossa pesquisa observamos a enzima CMY em duas amostras (17 e 57) que apresentam resistência às cefalosporinas de 3ª geração e ao monobactam. Essas amostras também apresentaram muitas marcas de resistência, tornando-as bactérias que merecem outros estudos, pois genes que conferem resistência às outras drogas podem estar localizados no mesmo plasmídeo que codifica a CMY, facilitando assim a sua propagação entre as bactérias de mesma espécie ou espécies distintas (Pope *et al.*, 2005).

A presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *ampC* e *cmv* em *E. coli* isoladas dos cães amostrados é um achado importante, uma vez que o contato íntimo entre humanos e cães oferece condições para a transmissão das amostras, e ainda, que estes animais podem servir de reservatórios. Esses resultados reforçam a necessidade do melhor controle no uso de antimicrobianos em animais de companhia. O papel de animais domésticos como reservatório de resistência bacteriana, precisa ser melhor investigado, uma vez que existe o risco de transferência de resistência bacteriana e/ou genes de resistência de animais para humanos. A ocorrência de genes de resistência em bactérias isoladas de animais domésticos é causa de alerta, uma vez que o contato com bactérias de cães e gatos é mais fácil do que o contato com bactérias de ambientes hospitalares. Mas nem sempre a população em geral possui esta informação, e não realizam a higienização das mãos após contato com o animal. Damborg *et al* (2009) descreveram a ocorrência de clones bacterianos em animais e seus respectivos donos. Das oito famílias analisadas, sete possuíam bactérias com o mesmo perfil genético das bactérias isoladas dos seus animais. E, a única família que não apresentou nenhum clone, afirmou que fazia a higienização das mãos quando tinha contato com o animal. Esse dado reforça a necessidade de boa

higienização das mãos quando há contato direto com o animal e também que não haja contato íntimo com os mesmos.

A habilidade da bactéria adquirir resistência e disseminar genes exógenos via elementos genéticos móveis, como plasmídios e transposons, têm sido um dos maiores fatores de desenvolvimento de múltipla resistência bacteriana nos últimos 50 anos. Os integrons são responsáveis pela disseminação entre bactérias Gram-negativas, principalmente em bactérias entéricas e na família das *Pseudomonas* (Mazel *et al.*, 2000). Os integrons estão associados a uma série de cassetes de resistência, mas a grande maioria contém o gene de resistência *aadA*, que codifica resistência a estreptomicina e espectinomicina. Determinantes de resistência a trimetoprim e sulfametoxazol também são detectados com frequência. Tal fato não é surpresa, uma vez que a combinação dessas duas drogas foi, e ainda é muito utilizada no tratamento de doenças infecciosas em animais e humanos (Fluit & Schmitz, 2004).

Os integrons também estão associados à resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, cloranfenicol, rifampicina, eritromicina, fosfomicina, lincomicina e anti-sépticos da família dos compostos de quaternário de amônio (Mazel, 2006). Pela alta ocorrência de resistência as drogas sulfametoxazol/trimetoprim e tetraciclina nas amostras de cães estudadas, podemos sugerir a participação de integron. No grupo de 67 amostras resistentes a pelo menos uma droga β -lactâmica, 26,9% apresentaram integrons, e no grupo de 91 amostras que não eram resistentes aos β -lactâmicos, somente 3,3% apresentaram integrons, levantando a hipótese que no grupo estudado, os integrons podem contribuir com resistência às drogas β -lactâmicas. A relação entre integron e resistência à β -lactâmicos precisa ser melhor investigada.

Em *E. coli* isoladas de animais, os integrons de classe 1 são mais frequentemente detectados comparados com os integrons de classe 2 (Goldstein *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2008; Cocchi *et al.*, 2009). Em nosso trabalho também foi observada maior

ocorrência de integrons de classe 1, sendo 71,4% pertencendo a essa classe e, 28,6% pertencendo a classe dos integrons de classe 2.

Até hoje, foram descritos mais de 80 cassetes de genes diferentes de integrons de classe 1, considerando somente aqueles cassetes que diferem por mais de 5% na sequência de nucleotídeos (Mazel, 2006). Este fato explicaria a diversidade de regiões variáveis do integron de classe 1.

Diferente do integron de classe 1, somente seis cassetes de resistência foram associados aos integrons de classe 2 (Biskri & Mazel, 2002; Ramirez *et al.*, 2005). Essa redução na diversidade é provavelmente devida ao fato que o gene que codifica a integrase do integron de classe 2 contém uma mutação *nonsense* no códon 179, desse modo gerando uma proteína não-funcional. A maioria dos genes de *intI2* descritos contem um *stop codon* interno, que torna a *IntI2* inativa, mas uma supressão desse *stop codon* ou a ação de recombinação *in trans* com outra integrase, como a de classe 1 (*IntI1*), que tem se mostrado capaz de reconhecer e recombinar com o sítio *attI1* do integron de classe 2 (*attI2*) permitindo assim, uma eventual aquisição de novos cassetes (Hansson *et al.*, 2002).

Nos estudos da distribuição dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *ampC* e *cmv* nos grupos A, B1 e B2, não foi possível fazer uma associação dos grupos filogenéticos com os genes de β -lactamases, uma vez que os genes estavam distribuídos aleatoriamente nos grupos.

E. coli do grupo B2 geralmente está associada com infecções extra-intestinais (Bingen *et al.*, 1998, Boyd & Harlt, 1998, Picard *et al.*, 1999, Johnson & Stell, 2000). Assim nossos resultados corroboram com a literatura uma vez que 59,7% das amostras foram alocadas nesse grupo, sendo que 38 das 40 amostras são de infecções do trato urinário e de piometra. As amostras alocadas no grupo A e B1 são classificadas como comensais e/ou patógenos oportunistas (Boyd & Harlt, 1998). Nos cães estudados foi observado 25,4% no grupo B1 e 14,9% no grupo A. No entanto, destacar que mesmo amostras comensais ou patógenos

oportunistas, num primeiro momento podem não causar doença, mas albergam genes de resistência. Dessa forma, em contato com a microbiota do próprio animal ou, no caso de transmissão para o proprietário, essas bactérias podem transmitir genes de resistência.

Recentemente, os estudos tem procurado relacionar integrons vs filogenia. Cocchi *et al* (2007) observaram que o grupo filogenético A era mais prevalente em amostras que possuíam integrons, e os grupos B2 e D com menor frequência. Sendo assim, bactérias conhecidas como comensais e não-patogênicas podem ser reservatórios de integrons. Este fato sugere que amostras virulentas podem adquirir genes de resistência de amostras comensais e assim sobreviver em ambientes com alta pressão de antibióticos. Curiosamente, são nesses ambientes que amostras pertencentes aos grupos filogenéticos associados a menor virulência são favorecidas. No presente estudo, observamos que as amostras que apresentaram integrons estavam alocadas com maior frequência nos grupos filogenéticos A e B1, corroborando assim os dados obtidos por Cocchi e colaboradores.

Diante a literatura consultada, esta é a primeira detecção de CTX-M-2 em amostras de *E. coli* isoladas de animais de companhia no Brasil. Muitos relatos demonstraram que essa enzima é frequentemente detectada em isolados clínicos de seres humanos hospitalizados (Garcia *et al.*, 2008; Picão *et al.*, 2009; Peirano *et al.*, 2009; Do Carmo Filho *et al.*, 2009). A ocorrência dessa variante em animais demonstra que essa enzima (CTX-M-2) não está restrita só em ambientes hospitalares de humanos, podendo estar disseminada também em cães. Essa afirmativa é reforçada pelos estudos realizados por Minarini *et al* (2009) que detectaram a enzima CTX-M-2 em amostras de *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *M. morganii* e *P. stuartii* isoladas de humanos da comunidade (Minarini *et al.*, 2009). O achado de CTX-M-2 em cão é preocupante em saúde pública, uma vez que esses animais podem servir de reservatório para bactérias que albergam o gene que codifica a CTX-M-2 e transferir aos seus proprietários. Assim, estudos da

dispersão de CTX-M em cepas isoladas na comunidade, animais de companhia e de produção no Brasil precisam ser realizados a fim de esclarecer a prevalência dessa enzima.

A enzima TEM-1 é a β -lactamase mais comumente encontrada em enterobactérias tanto em isolados de seres humanos, quanto de animais e ambiente. Mais de 90% das *E. coli* resistentes à ampicilina produzem a enzima TEM-1 (Bradford, 2001; Briñas *et al.*, 2002; Briñas *et al.*, 2005; Minarini *et al.*, 2007). Tal fato explicaria a ocorrência dessa enzima nas amostras estudadas.

Diante dos achados no presente estudo faz-se importante a conscientização de clínicos veterinários prescreverem antimicrobianos quando há a real necessidade. E também que seja feito com mais frequência o teste de sensibilidade bacteriana, o que reduziria a utilização inadequada das drogas antimicrobianas, evitando assim a seleção de linhagens resistentes e também infecções secundárias. A informação aos proprietários do uso correto, sem interrupções, em horários prescritos e dosagem adequada é fundamental, visto que a população em geral não tem o conhecimento de que o uso inadequado pode aumentar a pressão de seleção as cepas resistentes, colocando em risco a própria saúde e a de sua família.

VI. CONCLUSÃO

- Esse é o primeiro relato de *E. coli* produtora de ESBL isolada de animais de companhia no Brasil.
- As amostras isoladas de cães apresentaram alto índice de resistência às drogas ampicilina, tetraciclina, cefalexina e sulfametoxazol-trimetoprim, indicando provável uso constante destes fármacos, e que estes antimicrobianos não constituem a melhor escolha para os clínicos no tratamento de doenças infecciosas do trato geniturinário.
- Os genes de resistência *bla*_{TEM}, *ampC*, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} foram os mais comumente detectados em amostras isoladas de cães, demonstrando que esses animais podem servir de reservatórios de bactérias resistentes aos antimicrobianos.
- A ocorrência do gene *bla*_{TEM-1} e *bla*_{CTX-M-2} em amostras isoladas de cães mostram que estes animais podem servir de reservatórios de bactérias que albergam esses genes, podendo se transmitido para outros cães, e possivelmente para humanos.
- As amostras portadoras de integrons foram alocadas com maior frequência nos grupos filogenéticos não-patogênicos, tal fato não deve ser desconsiderado, uma vez que a mesma quando chega no novo hospedeiro não causa infecção, mas pode transmitir seus genes de resistência às bactérias microbiota.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M., HASMAN, H., AGERSØ, Y., JENSEN, L.B., HARKSEN, S., SVENSMARK, B. First description of *bla*_{CTX-M-1}-carrying *Escherichia coli* isolates in Danish primary food production. **Antimicrob Agents Chemother**, p.1258-1259, 2006.

ARAKAWA, Y., MURAKAMI, M., SUZUKI, K., ITO, H., WACHAROTAYANKUN, R., OHSUKA, S., KATO, N., OHTA, M. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. **Antimicrob Agentes Chemother**, v.39, p.1612-1615, 1995.

BABIC, M., HUJER, A.M., Bonomo, R.A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug Resistance Updates**, v.9, p.142–156, 2006.

BASS, L., LIEBERT, C.A., LEE, M.D., SUMMERS, A.O., WHITE, D.G., THAYER, S.G., MAURER, J.J. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.43, p.2925-2929, 1999.

BAUDET, C. & DIAS, Z. New EST Trimming Strategy. **Technical Report IC-05-09**, Institute of Computing - University of Campinas, 2005.

BAUERFEIND, A., STEMLINGER, I., JUNGWIRTH, R., MANGOLD, P., AMANN, S., AKALIN, E., *et al.* Characterization of β -lactamase gene *bla*_{PER-2}, which encoded an extended-spectrum class A β -lactamase. **J Antimicrob Chem**, v.40, p.616-620, 1996.

BINGEN, E., PICARD, B., BRAHIMI, N., MATHY, S., DESJARDINS, P., ELION, J., DENAMUR, E. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. **J Infect Dis**, v.177, p.642-650, 1998.

BISKRI, L. & MAZEL, D. Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in a unusual class 2 integron. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, p.3326-3331, 2003.

BOYD, E.F. & HARTL, D.L. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. **J Bacteriol**, v. 180, p. 1159-1165, 1998.

BOYD, D.A., TYLER, S., CHRISTIANSON, S., MCGEER, A., MULLER, A.P., WILLEY, B.M., BRYCE, E., GARDAM, M., NORDMANN, P., MULVEY, M.R. AND THE CANADIAN NOSOCOMIAL INFECTION SURVEILLANCE PROGRAM, HEALTH CANADA. Complete nucleotide sequence of a 92-Kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 Extended-Spectrum β -Lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, p.3758-3764, 2004.

BRADFORD, P. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. **Clin Microbil Rev**, v.14, p.933-951, 2001.

BRÍÑAS, L., ZARAZAGA, M., SAÉNZ, Y., RUIZ-LARREA, F., TORRES C. β -Lactamases in Ampicillin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Foods, Humans, and Healthy Animals. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, p. 3156-3163, 2002.

BRÍÑAS, L., MORENO, M.A., ZARAZAGA, M., PORRERO, C., SAÉNZ, Y., GARCÍA M., DOMÍNGUEZ, L., TORRES, C. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 β -Lactamases in *Escherichia coli* Fecal-Sample Isolates from Healthy Chickens. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, p. 2056-2058, 2003.

BRÍÑAS, L., MORENO, M.A., TESHAGER, T., SÁENZ, Y., PORRERO, C.M., DOMÍNGUEZ, L.S, TORRES, C. Monitoring and Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* Strains from Healthy and Sick Animals in Spain in 2003. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, p. 1262-1264, 2005.

BROWN, H.J, STOKES, H.W., HALL, R.M. The integrons In0, In2, and In5 are defective transposons derivatives. **J Bacteriol**, v.178, p.4429-4437, 1996.

BUSH, K. & JACOBY, G.A. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant β -lactamases. **Lahey Clinic** [Homepage na internet] 2003. [acesso em 22 jan 2008]. Disponível em: <http://www.lahey.org/> .

CAO, V., LAMBERT, T., NHU, D.Q., LOAN., H.K., HOANG, N.K., ARLET, G., COURVALIN, P. Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, p.3739-3743, 2002.

CARATTOLI, A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. **Vet Res**, v.32, p.243-259, 2001.

CARATTOLI, A. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers. **Clin Microbiol Infect**, v.14(1), p.117-123, 2008.

CARATTOLI, A., LOVARI, S., FRANCO, A., CORDARO, G., DI MATTEO, P., BATTISTI, A. Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, p.833-835, 2005.

CELENZA, G., PELLEGRINI, C., CACCAMO M., SEGATORE, B., AMICOSANTE, G., PERILLI, M. Spread of *bla*_{CTX-M}-type and *bla*_{PER-2} β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. **J Atimibrob Chem**, v.57, p. 975-978, 2006.

CHOPRA, I. & ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.65, p. 232-260, 2001.

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.

CLSI. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. CLSI document M100-S16. v.26, n.3, p.33-39.

COCCHI, S., GRASSELLI, E., GUTACKER, M., BENAGLI, C., CONVERT, M., PIFFARETTI, J.C. Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.50, p.126-132, 2007.

COLLIS, C.M., KIM, M.J., PARTRIDGE, S.R., STOKES, H.W., HALL, R.M. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. **J Bacteriol**, v.184, p.3017-3026, 2002.

CORREIA, M., BOAVIDA, F., GROSSO, F., SALGADO, M.J., LITO, L.M., CRISTINO, J.M., MENDO, S., DUARTE, A. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, p.2838-2843, 2003.

COSTA, D., POETA, P., BRINAS, L., SAENTZ, Y., RODRIGUES, J. TORRES, C. Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. **J Atimibrob Chem**, v.54, p.960-961, 2004.

COSTA, D., POETA, P., SAÉNZ, Y., ANA COELHO, C., MATOS, M., VINUÉD, L., RODRIGUES, J., TORRES, C. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. **Vet Mic**, v.127, p.97-105, 2008.

CORPET, D.E. Antibiotic resistance from food. **New Engl J Med**, v.318, p.1206-1207, 1988.

DAMBORG, P., NIELSEN, S.S., GUARDABASSI, L. *Escherichia coli* shedding patterns in humans and dogs: insights into within-household transmission of phylotypes associated with urinary tract infections. **Epidemiol Infect**, p.1-8, 2009.

DO CARMO FILHO, J.R., SILVA, R.M., CASTRANHEIRA, M., TOGNIM, M.C., GALES, A.C., SADER, H.S. Rrevalence and genetic characterization of *bla*CTX-M among *Klebsiella pneumonia* isolates collected in as intensive care unit in Brazil. **J Chemother**, v.20 (5), p.600-603, 2009.

DROPA, M., BALSALOBRE, L.C., LINCOPAN, N., MAMIZUKA, E.M., MURAKAMI, T., CASSETTARI, V.C., FRANCO, F., GUIDA, S.M., BALABAKIS, A.J., PASSADORE, L.F., SANTOS, S.R., MATTÉ, G.R., MATTÉ, M.H. Extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. **Ver Inst Med trop S Paulo**, v.51(4), p.203-209, 2009.

DUVAL-IFLAH, Y., GAINCHE, I., OURIET, M.F., LETT, M.C., HUBERT, J.C. Recombinant DNA transfer to *Escherichia coli* of human faecal origin in vitro and in digestive tract of gnotobiotic mice. **FEMS Microbiol Ecol**, v.15, p.79-88, 1994.

DZIDIC, S., BEDEKOVIC, V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. **Acta Pharmacol Sin**, v.24 (6), p.519-526, 2003.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M.C., GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment. **Genomic Research**, v.8, p. 175-185, 1998.

FÉRIA, C., FERREIRA, E., CORREIA, J.D., GONÇALVES, J., CANIÇA, M. Patterns and mechanisms of resistance to β -lactams and β -lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. **J Antimicrob Chemother**, v.49, p.77-85, 2002.

FERNANDES, S.A., PATERSON, D.L., GHILARDI-RODRIGUES, A.C., ADAMS-HADUCH, J.M., TAVECHIO, A.T., DOI, Y. CTX-M-2-Producing *Salmonella* Typhimurium Isolated from Pediatric Patients and Poultry in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v.15, p.317-323, 2009.

FLUIT, A.C. & SCHMITZ, F.J. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. **Eur J Clin Microbiol**, v.18, p.716-770, 1999.

FLUIT, A.C. & SCHMITZ, F.J. Resistance integrons and super-integrons. **Clin Microbiol Infect**, v.10(4), p.272-288, 2004.

FORBES, B.A., SAHM, D.F., WEISSFELD, A.S. BAILEY & SCOTT'S. Diagnostic Microbiology. p. 289-299. St. Louis, Mosby, 10^a ed, 1998.

FURUYA, E.Y. & LOWY F.D. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. **Nature**, v.4, p.36-46, 2006.

GARCIA, D.O., DOI, Y., SZABO, D., ADAMS-HADUCH, J.M., VAZ, T.M.I., LEITE, D., PADOVEZE, M.C., FREIRE, M.P., SILVEIRA, F.P., PATERSON, D.L. Multiclonal Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum β -Lactamase CTX-M-2 and Novel Variant CTX-M-59 in a Neonatal Intensive Care Unit in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p. 1790-1793, 2008.

GUARDABASSI, L., SCHWARTS, S., L. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **J Atimibrob Chem**, v.54, p. 321-332, 2004.

GILLINGS, M., BOUCHER, Y., LABBATE, M., HOLMES, A., KRISHNAN, S., HOLLEY, M., STROKES, H.W. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. **J Bacteriol**, v.190, p.5095-5100, 2008.

GIRLICH, D., NAAS, T., LEELAPORN, A. POIREL, L., FENNEWALD, M., NORDMANN, P. Nosocomial spread of the integron-located veb-1-like cassette encoding an extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. **Clin Infect Dis**, v.34, p.603-611, 2002.

GNIADKOWSKI, M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) and ESBL-producing microorganisms. **Clin Microbiol Infect**, v.7, p.597-608, 2001.

GOLDSTEIN, C., LEE, M.D., SANCHEZ, S., HUDSON, C., PHILLIPS, B., REGISTER, B., GRADY, M., LIEBERT, C., SUMMERS, A.O., WHITE, D., MAURER, J. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45(3), p.723-726, 2001.

HAGMAN R. & GREKO C. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from bitches with pyometra and from urine samples from other dogs. **Vet Rec**, v.157, p.193-107, 2005.

HALL, R.M. & COLLIS, C.M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. **Mol Microbiol**, v.15, p.593-600, 1995.

HART, W.S., HEUZENROEDER, M.W., BARTON, M.D. A study of the transfer of tetracycline resistance genes between *Escherichia coli* in the intestinal tract of a mouse and a chicken model. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, v.53, p.333-340, 2006.

HAMMERUM, A.M & HEUER, O.E. Human Health Hazards from Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* of Animal Origin. **Clin Infect Dis**, v.49, p.916-921, 2009.

HANSSON, K., SUNDSTRÖM, L., ROY, P.H. IntI2 integrons integrase in Tn7. **J Bacteriol**, v.184, p.1712-1721, 2002.

HERNÁNDEZ, J.R., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., CANTÓN, R., COQUE, T.M. PASCUAL, A. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. **Antimicrob Agents Chem**, v.49, p.2122-2125, 2005.

HOCHHUT, B., LOTFI, Y., MAZEL, D., FARUQUE, S.M., WOODGATE, R., WALDOR, M.K. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, p.2991-3000, 2001.

INTERNATIONAL FEDERATION FOR ANIMAL HEALTH. Annual Report 2002. [Homepage na Internet] 2003. [acesso em 2 nov 2009]. Disponível em http://www.ifahsec.org/international/annual_report/IFAHnnRep2002.pdf.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN JR, W.C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. p.795-865. Rio de Janeiro, 5ª ed, 2001.

L'ABEE-LUND, T.M., SORUM, H. Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fresh pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. **Microb Drug Resist**, v.7, p.263-272, 2001.

LAPIERRE, L., CORNEJO, J., BORIE, C., TORO, C., SAN MARTÍN, B. Genetic characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and class 2 integrons in commensal strains of *Escherichia coli* isolated from poultry and swine. **Microb Drug Resist**, v.14(4), p.265-272, 2008.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M.A., PAAUW, A., BOX, A.T.A., BLOK HEM VERHOEF, J., FLUIT, A.C. Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. **J Clin Microbiol**, v.40, p.3038-3040, 2002.

LÉVESQUE, C., PICHÉ, L., LAROSE, C., ROY, P.H. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39(1), p.185-191, 1995.

LICHT, T.R., STRUVE, C., CHRISTENSEN, B.B., POULSEN, R.L., MOLIN, S., KROGFELT, K.A. Evidence of increased spread and establishment of plasmid RP4 in the intestine under sub-inhibitory tetracycline concentrations. **FEMS Microbiol Ecol**, v.44, p.217-223, 2003.

LINTON, A.H., HOWE, K., BENNETT, P.M., RICHMOND, M.H., WHITESIDE, E.J. The colonization of the human gut by antibiotic resistant *Escherichia coli* from chickens. **J. Appl Bacteriol**, v.43, p.465-469, 1977.

LI, X.Z., MEHROTRA, M., GHIMIRE, S., ADEWOYE, L. β -lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. **Vet Mic**, v.121, p.197-214, 2007.

LIVERMORE, D. M. & PEARSON, A. Antibiotic resistance: location, location, location. **Clin Microbiol Infect**, v.13 (suppl 2), p.7–16, 2007

LLOYD, D.H. Reservoirs of Antimicrobial Resistance in Pet Animals. **Clin Infect Dis**, v.45 (suppl 2), p.148-152, 2008.

MACHADO, E., COQUE, T.M., CANTÓN, R., SOUSA, J.C., PEIXE, L. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. **J Bacteriol Chemother**, v.62, p. 296-302, 2008.

MACHADO, E., CANTÓN, R., BAQUERO, F., GALÁN, J.C., ROLLÁN, A., PEIXE, L., COQUE, T.M. Integron content of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49(5), p.1823-1829, 2005.

MARSHALL, B., SCHLUEDERBERG, S., TASHIBANA, C. LEVY, S.B. Survival and transfer in the human gut of poorly mobilizable (PBR322) and of transferable plasmids from the same carrier *Escherichia coli*. **Gene**, v.14, p.145-154, 1981.

MASON, I.S. & KIETZMANN, M. Cephalosporins – pharmacological basis of clinical use veterinary dermatology. **Vet. Dermat**, v.10, p.187-192, 1999.

MATSUMOTO, Y., IKEDA, F., KAMIMURA, T., YOKOTA, Y., MINE, Y. Novel plasmid-mediated β -lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. **Antimicrob Agent Chemother**, v.32, p.1243-1246, 1988.

MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nature**, v.4, p.608-620.

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

MCIVER, C.J., WHITE, P.A., JONES, L.A. Epidemic strains of *Shigella sonnei* biotype g carrying integrons. **J Clin Microbiol**, v.40, p.1538-1540, 2002.

MINARINI, L.A.R., GALES, A.C., PALAZZO, I.C.V., DARINI, A.L.C. Prevalence of Community-Occurring Extended Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Curr Microbiol**, v.54, p. 335-341, 2007.

MINARINI, L.A.R., CLÍMACO, E.C., GUIMARÃES, D.B., FERREIRA, J.C., PALAZZO, I.C.V., MARTINEZ, R.O, DARINI, A.L.C. Clonal Transmission of ESBL-Producing *Klebsiella* spp. at a University Hospital in Brazil. **Curr Microbiol**, p.56, v.587-591, 2008.

MINARINI, L.A.R., POIREL, L., TREVISANI, N.A.C., DARINI, A.L.C., NORDMANN, P. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diag Microb Infect Dis**, v.65, p. 202–206, 2009.

MORABITO, S., TOZZOLI, R., CAPRIOLI, A., KARCH, H., CARATTOLI, A. Detection and characterization of class 1 integrons in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Microb Drug Resist**, v.8, p.85-91, 2002.

NAAS, T., AUBERT, D., LAMBERT, T., NORDMANN, P. Complex genetic structure with repeated elements, a sul-type class 1 integron, and the blaVEB extended-spectrum β -lactamase gene. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, p.1745-1752, 2006 (b).

NAAS, T., BOGAERTS, P., BAURAING, C., DEGHELDRE, Y., GLUPCZYNSKI, Y., NORDMANN, P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum β -lactamase en *Acinetobacter baumannii* in Belgium. **J Antimicrob Chemother**, v.58, p.178-182, 2006 (a).

NAAS, T., COIGNARD, B., CARBONNE, A., BLANCKAERT, K., BAJOLET, O., BERNET, C., VERDEIL, X., ASTAGNEAU, P., DESENCLOS. J.C., NORDMANN, P., FRENCH NOSOCOMIAL INFECTION EARLY WARNING INVESTIGATION AND SURVEILLANCE NETWORK. VEB1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. **Emerg Infect Dis**, v.12, p.1214-1222, 2006 (b).

NAAS, T., POIREL, L., NORDANN, P. Minor extended-spectrum β -lactamases. **Clin Microbiol Infect**, v.14 (suppl.1), p.42-52, 2008.

NCCLS. *Performace Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition*. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvanis 19087-1898 USA, 2003.

OCHMAN, H.; SELANDER, R.K. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. **J Bacteriol**, v.157, p.690-692, 1984.

OZGUMUS, O.B., SANDALLI, C., SEVIM, A., CELIK-SEVIM, E., SIVRI, N. Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey. **J Microbiol**, v.47(1), p.19-27, 2009.

PARTIDGE, S.R., TSAFNAT, G., COEIRA, E., IREDEL, J.R. Gene cassettes and cassettes array in mobile resistance integrons. **FEMS Microbiol Rev**, v.33, p.757-784, 2009.

PEDERSEN, K., PEDERSEN, K., JENSEN H., FINSTER K., JENSEN V.F., HEUER, O.E. Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, p.775-781, 2007.

PEIRANO, G., SEKI, L.M., VAL PASSOS, V.L., PINTO, M.C.F.G., GUERRA, L.R., ASENSI, M.D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v.63, p. 265–268, 2009.

PEREZ, F., ENDIMIANI, A., HUJER, K.M., BONOMO, R.A. The continuing challenge of ESBL. **Curr Opt in Pharm**, v.7, p.459-469, 2007.

PETERSEN, A., GUARDABASSI, L., DALSGAARD, A., OLSEN, J.E. Class 1 integrons containing a *dhfrI* trimethoprim resistance gene cassettes in aquatic *Acinetobacter* ssp. **FEMS Microbiol Lett**, v.182, p.73-76, 2000.

PETERSON, D.L. & BONOMO, R.A. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. **Clin Microb Rev**, v.8 (4), p.567-686, 2005.

PETERSON, D.L. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **AJIC**, v.34 (5), p.20-28, 2006.

PFALLES, M.A. & SEGRETI, J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum β -lactamases. **Clin Infect Dis**, v.42, p.153-163, 2006.

PHILIPPON, A., ARLET, G., JACOBY, G.A. Plasmid-Determined AmpC-Type β -Lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, p.1-11, 2002.

PICÃO, R.C., POIREL, L., GALES, A.C., NORDMANN, P. Diversity of beta-lactamase produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infection on Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53(9), p.3908-3913, 2009.

PICARD, B., GARCIA, J.S., GOURIOU, S., DURIEZ, P., BRAHIMI, N., BINGEN, E., ELION, J., DENAMUR, E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infect Immun**, v.67, p.546-553, 1999.

PLOY, M.C., DENIS, F., COURVALIN, P., LAMBERT, T. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. **Antimicrob Agents Chemother**, v.44, p.2684-2688, 2000.

POIREL, L., WELDHAGEN, G.F., NAAS, T., DE CHAMPS, C., DOVE, M.G., NORDMANN, P. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, p.2598-2603, 2001.

POIREL, L., VAN DE LOO, M., MAMMERI, H., NORDMANN, P. Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended-spectrum β -lactamase VEB-1. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, p.3091-3094, 2005.

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 the turkey poult intestinal tract. **Appl Environ Microbiol**, v.71, p.1184–1192, 2005.

RADSTROM, P., STÖLD, O., SWEDBERG, G., FLENSBURG, J., ROY, P.H, SUNDSTRÖM, L. Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. **J Bacteriol**, v.176, p.3257-3268, 1994.

RAMIREZ, M.S., QUIROGA, C., CENTRON, D. Novel rearrangement of a class 2 integron in two non-epidemiology related isolates *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, p.5159-5181, 2005.

RECCHIA, G.D. & HALL, R.M. Gene cassettes: a new class of mobile element. **Microbiology**, v.141, p.3015-3027, 1995.

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

SALADIN, M., CAO, V.T., LAMBERT, T., DONAY, J.L., HERRMANN, J.L., OULD-HOCINE, Z., VERDET, C., DELISLE, F., PHILIPPON, A., ARLET, G. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiol Lett**, v.209 (2), p.161-168, 2002.

SAMAHA-KFOURY J.N. & ARAJ, G.F. Recent developments in β -lactamases and extended-spectrum β -lactamases. **BMJ**, v.327, p. 1209-1213, 2003.

SANCHEZ, S., MCCRACKIN STEVERSON, M.A., HUDSON, C.R., MAIER, M., BUFFINGTON, T., DAM, Q., MAURER, J.J. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. **J Clin Microbiol**, v.40, p.3586-3595, 2002.

SANGUINETTI, M., POSTERARO, B., SPANU, T., CICCAGLIONE, D., ROMANO, L., FIORI, B., *et al.* Characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD

Phoenix Extended-Spectrum β -lactamases detection method. **J Clin Microbiol**, v.41, p.1463-1468, 2004.

SAYAH, R.S., KANEENE, J.B., JOHNSON, Y., MILLER, R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. **Appl Environ Microbiol**, v.71(3), p. 1394-1404, 2005.

SCHNBEL, E.L. & JONES, A.L. Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among phyloplane bacteria in Michigan apple orchards. **Appl Environ Microbiol**, v.65, p. 4898-4907.

SCHWARZ, S., KEHRENBURG, C., WALSH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **Int J Antimicrob Agents**, v,17(6), p.431-437, 2001.

SELANDER, R.K.; CAUGANT, D.A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J.M.; GILMOUR, M.N.; WHITTAM, T.S. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*, In: NEIDHARDT, F.C.; INGRAHAM, J.L.; LOW, K.B.; MAGASSANIK, B.; SCHACCHTER M.; UMBARGER, H.E. (Ed.) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987. p. 1625-1648.

SHAH, A.A., HANSAN, F., AHMED, S., HAMEED, A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. **Res Microbiol**, v.155, p.409-421, 2004.

SIQUEIRA, A.K. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário, piometra e fezes de cães. 136f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

SMITH, H.W. Transfer of antibiotic resistance from animal and human strains of *Escherichia coli* to resistant *E. coli* in the alimentary tract of man. **Lancet**, v.1, p.1174-1176, 1969.

STROKES, H.W., NESBO, C.L., HOLLEY, M., BAHL, M.I., GILLINGS, M.R., BOUCHER, Y. Class 1 integrons potentially predating the association with Tn402-like transposition genes are the present in a sediment microbial community. **J Bacteriol**, v.188,p.5722-5730, 2006.

STÜRENBUG, E. & MARK, D. Extended-spectrum β -lactamases: implication for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. **J Infect**, v.47, p.237-295, 2005.

SUNDE, M. & SORUM, H. Characterization of integron in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. **Microb Drug Resist**, v.5, p.279-287, 2000.

SUNDE, M. & SORUM, H. Self-transmissible multidrug resistance plasmids in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of health swine. **Microb Drug Resist**, v.7, p.191-196, 2001.

TAVARES, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

TESHAGER, T., DOMINGUEZ, L., MORENO, M.A. Beta-lactamase characterization en *Escherichia coli* isolated with diminished susceptibility or resistance to extended-spectrum cephalosporins recovered from sick animals in Spain. **Micro Drug Resist**, v.9, p.607-610, 2003.

TOLEMAN, M.A., BENNETT, P.M., WALSH, T.R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? **Microbiol Mol Biol**, v.70, p.296-326, 2006.

TROBOS, M., LESTER, C.H., OLSEN, J.E., FRIMODT-MØLLER, N., HAMMERUM, A.M. Natural transfer of sulphonamide and ampicillin resistance between *Escherichia coli* residing the human intestine. **J Antimicrob Chemother**, v.63, p.80-86, 2008.

VILLEGAS, M.V., KATTAN, J.N., QUINTEROS, M.G., CASELLAS, J.M. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. **Clin Microbiol Infect**, v.14 (Suppl. 1), p.154-158, 2008.

WATSON, A.D. & ROSIN, E. Antimicrobial drug use in dogs and cats. In **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**, 3rd, p.537-375.

WELDHAGEN, G.F., POIREL, L., NORDMANN, P. Abler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. **Antimicrob Agen Chem**, v.47, p.2385-2392, 2003.

WHITE, P.A., MCIVER, C.J., DENG, Y., RAWLINSON, W.D. Characterization of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfrA17*. **FEMS Microbiol Lett**, v.182, p.265-269, 2000.

WHITE, P.A., MCIVER, C.J., DENG, Y., RAWLINSON, W.D. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45(9), p.2658-2661, 2001.

WITTE, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **Science**, v.279, p.996-997, 1998.

Anexo 1. Tabela geral do perfil de resistência e genes de β -lactamases nas amostras isoladas de cães.

Cepa	Diagnóstico	ANTIBIÓTICOS																				GENES DE RESISTÊNCIA							
		AMI	GEN	KAN	STR	NAL	CIP	ENR	NOR	STX	CHL	FLO	TET	AMP	CFX	CFT	CAZ	CRO	CTX	CFP	ATM	AMC	<i>bla</i> TEM	<i>bla</i> SHV	<i>bla</i> GES	<i>bla</i> CTX-M	<i>bla</i> OXA	<i>amp</i> C	<i>cmv</i>
1	PIO	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
2	PIO	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
21	PIO	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
22	PIO	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
26	PIO	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
29	PIO	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
33	PIO	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
36	PIO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	+	+	-	+	-	+	-
53	PIO	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	+	+	-	-	-	-	-
54	PIO	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
56	PIO	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
58	PIO	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
59	PIO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
60	PIO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
66	PIO	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	+	-
67	PIO	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	+	-
70	PIO	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
73	PIO	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
77	PIO	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
78	PIO	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
96	PIO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
97	PIO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-

Anexo 1. Continuação.

Cepa	Diagnóstico	ANTIBIÓTICOS																				GENES DE RESISTÊNCIA							
		AMI	GEN	KAN	STR	NAL	CIP	ENR	NOR	STX	CHL	FLO	TET	AMP	CFX	CFT	CAZ	CRO	CTX	CFP	ATM	AMC	<i>bla</i> TEM	<i>bla</i> SHV	<i>bla</i> GES	<i>bla</i> CTX-M	<i>bla</i> OXA	<i>amp</i> C	<i>cmv</i>
3	ITU	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
7	ITU	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	+	-
8	ITU	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
11	ITU	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
17	ITU	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	+	-	-	-	-	+	+
20	ITU	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
28	ITU	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
30	ITU	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
40	ITU	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
46	ITU	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
48	ITU	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
50	ITU	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
51	ITU	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	+	-	-	-	-	+	-
52	ITU	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
55	ITU	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
57	ITU	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	+	-	-	-	-	+	+
61	ITU	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
68	ITU	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
71	ITU	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
72	ITU	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
75	ITU	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
76	ITU	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
79	ITU	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
80	ITU	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
81	ITU	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
82	ITU	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
83	ITU	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
84	ITU	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-

Anexo 1. Continuação.

Cepa	Diagnóstico	ANTIBIÓTICOS																				GENES DE RESISTÊNCIA							
		AMI	GEN	KAN	STR	NAL	CIP	ENR	NOR	STX	CHL	FLO	TET	AMP	CFX	CFT	CAZ	CRO	CTX	CFP	ATM	AMC	<i>bla</i> TEM	<i>bla</i> SHV	<i>bla</i> GES	<i>bla</i> CTX-M	<i>bla</i> OXA	<i>amp</i> C	<i>cmy</i>
85	ITU	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
86	ITU	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
87	ITU	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
88	ITU	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
89	ITU	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	+	-
91	ITU	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
94	ITU	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	+	+	-	-	-	-	-
95	ITU	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	-	-
98	ITU	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
99	ITU	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
100	ITU	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
101	ITU	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
102	ITU	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
16C	FN	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	+	-	-	+	-	+	-
23C	FN	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
28C	FN	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+		+	-
31C	FN	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-
48C	FN	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	+	+	-	+	-	+	-
53C	FN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-	-	+	-
54C	FN	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	+	-	+	-

PIO – Piometra; ITU – Infecção do Trato Urinário; FN – Fezes de animais sadios; AMI – Amikacina; GEN – Gentamicina; KAN – Kanamicina; STR – Estreptomicina; NAL – Ácido Nalidíxico; CIP – Ciprofloxacino; ENR – Enrofloxacino; NOR – Norfloxacin; STX – Sulfametoxazol-Trimetoprim; CHL – Cloranfenicol; FLO – Florfenicol; TET – Tetraciclina; AMP – Ampicilina; CFX – Cefalexina; CFT – Ceftiofur; CAZ- Ceftazidima; CRO – Ceftriaxona; CTX – Cefotaxima; CFP – Cefepima; ATM – Aztreonam; AMC – Amoxicilina+Ácido Clavulânico.

Anexo 2. Alinhamento do gene *bla*_{TEM-1} da amostra 16C no programa ClustalX.

```

FJ405208.1_  -----ATGAGTATTCAACATTTCCGAGTCGCCCTTATTCCCTTTT 40
FJ405193.1_  -----ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTT 40
FJ405203.1_  -----ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTT 40
16_          AATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTT 120
                *****

FJ405208.1_  TTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATG 100
FJ405193.1_  TTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATG 100
FJ405203.1_  TTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATG 100
16_          TTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATG 180
                *****

FJ405208.1_  CTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGA 160
FJ405193.1_  CTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGA 160
FJ405203.1_  CTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGA 160
16_          CTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGA 240
                *****

FJ405208.1_  TCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGC 220
FJ405193.1_  TCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGC 220
FJ405203.1_  TCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGC 220
16_          TCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGC 300
                *****

FJ405208.1_  TATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATAC 280
FJ405193.1_  TATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATAC 280
FJ405203.1_  TATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATAC 280
16_          TATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATAC 360
                *****

FJ405208.1_  ACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATG 340
FJ405193.1_  ACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATG 340
FJ405203.1_  ACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATG 340
16_          ACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATG 420
                *****

FJ405208.1_  GCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCA 400
FJ405193.1_  GCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCA 400
FJ405203.1_  GCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCA 400
16_          GCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCA 480
                *****

FJ405208.1_  ACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGG 460
FJ405193.1_  ACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGG 460
FJ405203.1_  ACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGG 460
16_          ACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGG 540
                *****

FJ405208.1_  GGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACG 520
FJ405193.1_  GGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACG 520
FJ405203.1_  GGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACG 520
16_          GGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACG 600
                *****

FJ405208.1_  ACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATATTAAC TG 580
FJ405193.1_  ACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATATTAAC TG 580
FJ405203.1_  ACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATATTAAC TG 580
16_          ACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATATTAAC TG 660
                *****

```

FJ405208.1_	GCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAG	640
FJ405193.1_	GCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAG	640
FJ405203.1_	GCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAG	640
16_	GCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAG	720

FJ405208.1_	TTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG	700
FJ405193.1_	TTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG	700
FJ405203.1_	TTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG	700
16_	TTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG	780

FJ405208.1_	GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCT	760
FJ405193.1_	GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCT	760
FJ405203.1_	GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCT	760
16_	GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCT	840

FJ405208.1_	CCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGAC	820
FJ405193.1_	CCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGAC	820
FJ405203.1_	CCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGAC	820
16_	CCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGAC	900

FJ405208.1_	AGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA-----	861
FJ405193.1_	AGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA-----	861
FJ405203.1_	AGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA-----	861
16_	AGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGAGCAAGAGTAGT	960

Anexo 3. Alinhamento do gene *bla*_{TEM-1} da amostra 57 no programa ClustalX.

```

FJ405208.1_ -----ATGAGTATTCAACATTTCCGAGTCGCCCTT 30
FJ405193.1_ -----ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTT 30
57_ ATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATATGAGTATTCAACATTTTCGTGTCGCCCTT 120
FJ405203.1_ -----ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTT 30
***** ** *****

FJ405208.1_ ATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAA 90
FJ405193.1_ ATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAA 90
57_ ATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAA 180
FJ405203.1_ ATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAA 90
*****

FJ405208.1_ GTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAAC 150
FJ405193.1_ GTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAAC 150
57_ GTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAAC 240
FJ405203.1_ GTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAAC 150
*****

FJ405208.1_ AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTT 210
FJ405193.1_ AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTT 210
57_ AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTT 300
FJ405203.1_ AGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTT 210
*****

FJ405208.1_ AAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGT 270
FJ405193.1_ AAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGT 270
57_ AAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGT 360
FJ405203.1_ AAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGT 270
*****

FJ405208.1_ CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCCAGTCACAGAAAAGCAT 330
FJ405193.1_ CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCCAGTCACAGAAAAGCAT 330
57_ CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCCAGTCACAGAAAAGCAT 420
FJ405203.1_ CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCCAGTCACAGAAAAGCAT 330
*****

FJ405208.1_ CTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAC 390
FJ405193.1_ CTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAC 390
57_ CTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAC 480
FJ405203.1_ CTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAC 390
*****

FJ405208.1_ ACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTTG 450
FJ405193.1_ ACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTTG 450
57_ ACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTTG 540
FJ405203.1_ ACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTTG 450
*****

FJ405208.1_ CACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCC 510
FJ405193.1_ CACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCC 510
57_ CACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCC 600
FJ405203.1_ CACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCC 510
*****

FJ405208.1_ ATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAA 570
FJ405193.1_ ATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAA 570
57_ ATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAA 660
FJ405203.1_ ATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAA 570
*****

```

FJ405208.1_	CTATTAAC	TGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG	630
FJ405193.1_	CTATTAAC	TGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG	630
57_	CTATTAAC	TGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG	720
FJ405203.1_	CTATTAAC	TGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG	630

FJ405208.1_	GCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCT		690
FJ405193.1_	GCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCT		690
57_	GCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCT		780
FJ405203.1_	GCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCT		690

FJ405208.1_	GATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGAT		750
FJ405193.1_	GATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGAT		750
57_	GATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGAT		840
FJ405203.1_	GATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGAT		750

FJ405208.1_	GGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA		810
FJ405193.1_	GGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA		810
57_	GGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA		900
FJ405203.1_	GGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA		810

FJ405208.1_	CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA-----		861
FJ405193.1_	CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA-----		861
57_	CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGGA		960
FJ405203.1_	CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA-----		861

Anexo 4. Alinhamento do gene *bla*_{TEM-1} da amostra 31C no programa ClustalX.

```

FJ405208.1_ -----ATGAGTATTCAACATTTCCTGAGTCGCCCTTATTCCC 36
FJ405193.1_ -----ATGAGTATTCAACATTTCCTGAGTCGCCCTTATTCCC 36
FJ405203.1_ -----ATGAGTATTCAACATTTCCTGAGTCGCCCTTATTCCC 36
31C_ CAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCTGAGTCGCCCTTATTCCC 120
          *****

FJ405208.1_ TTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAA 96
FJ405193.1_ TTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAA 96
FJ405203.1_ TTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAA 96
31C_ TTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAA 180
          *****

FJ405208.1_ GATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGT 156
FJ405193.1_ GATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGT 156
FJ405203.1_ GATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGT 156
31C_ GATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGT 240
          *****

FJ405208.1_ AAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTT 216
FJ405193.1_ AAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTT 216
FJ405203.1_ AAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTT 216
31C_ AAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTT 300
          *****

FJ405208.1_ CTGCTATGTGTTGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGC 276
FJ405193.1_ CTGCTATGTGTTGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGC 276
FJ405203.1_ CTGCTATGTGTTGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGC 276
31C_ CTGCTATGTGTTGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGC 360
          *****

FJ405208.1_ ATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACG 336
FJ405193.1_ ATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACG 336
FJ405203.1_ ATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACG 336
31C_ ATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACG 420
          *****

FJ405208.1_ GATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCT 396
FJ405193.1_ GATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCT 396
FJ405203.1_ GATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCT 396
31C_ GATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCT 480
          *****

FJ405208.1_ GCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAAC 456
FJ405193.1_ GCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAAC 456
FJ405203.1_ GCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAAC 456
31C_ GCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAAC 540
          *****

FJ405208.1_ ATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA 516
FJ405193.1_ ATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA 516
FJ405203.1_ ATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA 516
31C_ ATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA 600
          *****

FJ405208.1_ AACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTA 576
FJ405193.1_ AACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTA 576
FJ405203.1_ AACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTA 576
31C_ AACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTA 660
          *****

```

FJ405208.1_	ACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGAT	636
FJ405193.1_	ACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGAT	636
FJ405203.1_	ACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGAT	636
31C_	ACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGAT	720

FJ405208.1_	AAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAA	696
FJ405193.1_	AAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAA	696
FJ405203.1_	AAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAA	696
31C_	AAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAA	780

FJ405208.1_	TCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAG	756
FJ405193.1_	TCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAG	756
FJ405203.1_	TCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAG	756
31C_	TCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAG	840

FJ405208.1_	CCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAAT	816
FJ405193.1_	CCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAAT	816
FJ405203.1_	CCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAAT	816
31C_	CCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAAT	900

FJ405208.1_	AGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA-----	861
FJ405193.1_	AGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA-----	861
FJ405203.1_	AGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA-----	861
31C_	AGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTT	960

Anexo 5. Alinhamento do gene *bla*_{TEM-1} das amostras 57, 16C e 31C

```

16C_      ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCT 60
31C_      ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCT 60
57_      ATGAGTATTCAACATTTTCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCT 60
          *****

16C_      GTTTTTGCTCAGCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA 120
31C_      GTTTTTGCTCAGCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA 120
57_      GTTTTTGCTCAGCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA 120
          *****

16C_      CGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC 180
31C_      CGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC 180
57_      CGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC 180
          *****

16C_      GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCC 240
31C_      GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCC 240
57_      GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCAGGTATTATCC 240
          *****

16C_      CGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG 300
31C_      CGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG 300
57_      CGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG 300
          *****

16C_      GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA 360
31C_      GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA 360
57_      GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA 360
          *****

16C_      TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATC 420
31C_      TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATC 420
57_      TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGTGCCAACTTACTTCTGACAACGATC 420
          *****

16C_      GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT 480
31C_      GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT 480
57_      GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT 480
          *****

16C_      GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG 540
31C_      GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG 540
57_      GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG 540
          *****

16C_      CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCT 600
31C_      CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCT 600
57_      CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCT 600
          *****

16C_      TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC 660
31C_      TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC 660
57_      TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC 660
          *****

16C_      TCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT 720
31C_      TCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT 720
57_      TCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT 720
          *****

```

16C_	CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC	780
31C_	CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC	780
57_	CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC	780

16C_	ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC	840
31C_	ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC	840
57_	ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC	840

16C_	TCACTGATTAAGCATTGGTAA	861
31C_	TCACTGATTAAGCATTGGTAA	861
57_	TCACTGATTAAGCATTGGTAA	861

Anexo 6. Alinhamento do gene *bla*_{CTX-M-2} da amostra 16C no programa ClustalW.

```

16C_          GGATTTTTTAATGATGACTCAGAGCATTGCGCGCTCAATGTTAACGGTGATGGCGACGCTA 420
FJ815286.1_  -----ATGATGACTCAGAGCATTGCGCGCTCAATGTTAACGGTGATGGCGACGCTA 51
FJ815249.1_  -----ATGATGACTCAGAGCATTGCGCGCTCAATGTTAACGGTGATGGCGACGCTA 51
FJ815264.1_  -----ATGATGACTCAGAGCATTGCGCGCTCAATGTTAACGGTGATGGCGACGCTA 51
                *****

16C_          CCCCTGCTATTTAGCAGCGCAACGCTGCATGCGCAGGCGAACAGCGTGCAACAGCAGCTG 480
FJ815286.1_  CCCCTGCTATTTAGCAGCGCAACGCTGCATGCGCAGGCGAACAGCGTGCAACAGCAGCTG 111
FJ815249.1_  CCCCTGCTATTTAGCAGCGCAACGCTGCATGCGCAGGCGAACAGCGTGCAACAGCAGCTG 111
FJ815264.1_  CCCCTGCTATTTAGCAGCGCAACGCTGCATGCGCAGGCGAACAGCGTGCAACAGCAGCTG 111
                *****

16C_          GAAGCCCTGGAGAAAAGTTCGGGAGGTCGGCTTGGCGTTGCGCTGATTAACACCGCCGAT 540
FJ815286.1_  GAAGCCCTGGAGAAAAGTTCGGGAGGTCGGCTTGGCGTTGCGCTGATTAACACCGCCGAT 171
FJ815249.1_  GAAGCCCTGGAGAAAAGTTCGGGAGGTCGGCTTGGCGTTGCGCTGATTAACACCGCCGAT 171
FJ815264.1_  GAAGCCCTGGAGAAAAGTTCGGGAGGTCGGCTTGGCGTTGCGCTGATTAACACCGCCGAT 171
                *****

16C_          AATTCGCAGATTCTCTACCGTGCCGATGAACGTTTTTGCGATGTGCAGTACCAGTAAGGTG 600
FJ815286.1_  AATTCGCAGATTCTCTACCGTGCCGATGAACGTTTTTGCGATGTGCAGTACCAGTAAGGTG 231
FJ815249.1_  AATTCGCAGATTCTCTACCGTGCCGATGAACGTTTTTGCGATGTGCAGTACCAGTAAGGTG 231
FJ815264.1_  AATTCGCAGATTCTCTACCGTGCCGATGAACGTTTTTGCGATGTGCAGTACCAGTAAGGTG 231
                *****

16C_          ATGGCGGCCGCGCGCGGTGCTTAAACAGAGCGAGAGCGATAAGCACCTGCTAAATCAGCGC 660
FJ815286.1_  ATGGCGGCCGCGCGCGGTGCTTAAACAGAGCGAGAGCGATAAGCACCTGCTAAATCAGCGC 291
FJ815249.1_  ATGGCGGCCGCGCGCGGTGCTTAAACAGAGCGAGAGCGATAAGCACCTGCTAAATCAGCGC 291
FJ815264.1_  ATGGCGGCCGCGCGCGGTGCTTAAACAGAGCGAGAGCGATAAGCACCTGCTAAATCAGCGC 291
                *****

16C_          GTTGAAATCAAGAAGAGCGACCTGGTTAACTACAATCCCATTGCGGAGAAACACGTTAAC 720
FJ815286.1_  GTTGAAATCAAGAAGAGCGACCTGGTTAACTACAATCCCATTGCGGAGAAACACGTTAAC 351
FJ815249.1_  GTTGAAATCAAGAAGAGCGACCTGGTTAACTACAATCCCATTGCGGAGAAACACGTTAAC 351
FJ815264.1_  GTTGAAATCAAGAAGAGCGACCTGGTTAACTACAATCCCATTGCGGAGAAACACGTTAAC 351
                *****

16C_          GGCACGATGACGCTGGCTGAGCTTGGCGCAGCGGCGCTGCAGTATAGCGACAATACTGCC 780
FJ815286.1_  GGCACGATGACGCTGGCTGAGCTTGGCGCAGCGGCGCTGCAGTATAGCGACAATACTGCC 411
FJ815249.1_  GGCACGATGACGCTGGCTGAGCTTGGCGCAGCGGCGCTGCAGTATAGCGACAATACTGCC 411
FJ815264.1_  GGCACGATGACGCTGGCTGAGCTTGGCGCAGCGGCGCTGCAGTATAGCGACAATACTGCC 411
                *****

16C_          ATGAATAAGCTGATTGCCCATCTGGGTGGTCCCGATAAAGTGACGGCGTTTGCTCGCTCG 840
FJ815286.1_  ATGAATAAGCTGATTGCCCATCTGGGTGGTCCCGATAAAGTGACGGCGTTTGCTCGCTCG 471
FJ815249.1_  ATGAATAAGCTGATTGCCCATCTGGGTGGTCCCGATAAAGTGACGGCGTTTGCTCGCTCG 471
FJ815264.1_  ATGAATAAGCTGATTGCCCATCTGGGTGGTCCCGATAAAGTGACGGCGTTTGCTCGCTCG 471
                *****

16C_          TTGGGTGATGAGACCTTCCGTCTGGACAGAACCGAGCCCACGCTCAATACCGCCATTCCA 900
FJ815286.1_  TTGGGTGATGAGACCTTCCGTCTGGACAGAACCGAGCCCACGCTCAATACCGCCATTCCA 531
FJ815249.1_  TTGGGTGATGAGACCTTCCGTCTGGACAGAACCGAGCCCACGCTCAATACCGCCATTCCA 531
FJ815264.1_  TTGGGTGATGAGACCTTCCGTCTGGACAGAACCGAGCCCACGCTCAATACCGCCATTCCA 531
                *****

16C_          GGCGACCCGCGTGATACCACCACGCCGCTCGCGATGGCGCAGACCCTGAAAAATCTGACG 960
FJ815286.1_  GGCGACCCGCGTGATACCACCACGCCGCTCGCGATGGCGCAGACCCTGAAAAATCTGACG 591
FJ815249.1_  GGCGACCCGCGTGATACCACCACGCCGCTCGCGATGGCGCAGACCCTGAAAAATCTGACG 591
FJ815264.1_  GGCGACCCGCGTGATACCACCACGCCGCTCGCGATGGCGCAGACCCTGAAAAATCTGACG 591
                *****

```

16C_	CTGGGTAAAGCGCTGGCGGAAACTCAGCGGGCACAGTTGGTGACGTGGCTTAAGGGCAAT	1020
FJ815286.1_	CTGGGTAAAGCGCTGGCGGAAACTCAGCGGGCACAGTTGGTGACGTGGCTTAAGGGCAAT	651
FJ815249.1_	CTGGGTAAAGCGCTGGCGGAAACTCAGCGGGCACAGTTGGTGACGTGGCTTAAGGGCAAT	651
FJ815264.1_	CTGGGTAAAGCGCTGGCGGAAACTCAGCGGGCACAGTTGGTGACGTGGCTTAAGGGCAAT	651

16C_	ACTACCGGTAGCGCGAGCATTCGGGCGGGTCTGCCGAAATCATGGGTAGTGGGCGATAAA	1080
FJ815286.1_	ACTACCGGTAGCGCGAGCATTCGGGCGGGTCTGCCGAAATCATGGGTAGTGGGCGATAAA	711
FJ815249.1_	ACTACCGGTAGCGCGAGCATTCGGGCGGGTCTGCCGAAATCATGGGTAGTGGGCGATAAA	711
FJ815264.1_	ACTACCGGTAGCGCGAGCATTCGGGCGGGTCTGCCGAAATCATGGGTAGTGGGCGATAAA	711

16C_	ACCGGCAGCGGAGATTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTTATCTGGCCGAAAACCAC	1140
FJ815286.1_	ACCGGCAGCGGAGATTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTTATCTGGCCGAAAACCAC	771
FJ815249.1_	ACCGGCAGCGGAGATTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTTATCTGGCCGAAAACCAC	771
FJ815264.1_	ACCGGCAGCGGAGATTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTTATCTGGCCGAAAACCAC	771

16C_	GCACCGCTGGTTCTGGTGACCTACTTTACCCAACCGGAGCAGAAGGCGGAAAGCCGTCGG	1200
FJ815286.1_	GCACCGCTGGTTCTGGTGACCTACTTTACCCAACCGGAGCAGAAGGCGGAAAGCCGTCGG	831
FJ815249.1_	GCACCGCTGGTTCTGGTGACCTACTTTACCCAACCGGAGCAGAAGGCGGAAAGCCGTCGG	831
FJ815264.1_	GCACCGCTGGTTCTGGTGACCTACTTTACCCAACCGGAGCAGAAGGCGGAAAGCCGTCGG	831

16C_	GATATTCTGGCTGCGGCGGCGAAAATCGTAACCCACGGTTTCTGATGCAATAAATGGAGC	1260
FJ815286.1_	GATATTCTGGCTGCGGCGGCGAAAATCGTAACCCACGGTTTC-----	873
FJ815249.1_	GATATTCTGGCTGCGGCGGCGAAAATCGTAACCCACGGTTTC-----	873
FJ815264.1_	GATATTCTGGCTGCGGCGGCGAAAATCGTAACCCACGGTTTC-----	873
