

Diana Manuela Ferreira de Meireles

Caracterização molecular da resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro alargado isoladas em cães e estudo da partilha de clones bacterianos entre animais de companhia e coabitantes humanos.

Mestrado em

Tecnologia Bioquímica em Saúde

Setembro de 2013

Caracterização molecular da resistência a antimicrobianos em *E. coli* produtoras de β -lactamases de espectro alargado isoladas em cães e estudo da partilha de clones bacterianos entre animais de companhia e coabitantes humanos.

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DO PORTO
INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

Diana Manuela Ferreira de Meireles

**Caracterização molecular da resistência a antimicrobianos em
Escherichia coli produtoras de β -lactamases de espectro alargado
isoladas em cães e estudo da partilha de clones bacterianos entre
animais de companhia e coabitantes humanos.**

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde realizada sob orientação científica do Professor Doutor Paulo Martins da Costa (Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto) e pelo Professor Doutor Rúben Fernandes (Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto).

Setembro, 2013

Agradecimentos

Agradeço,

ao Professor Paulo Costa por me ter recebido no seu laboratório e me ter dado oportunidade de trabalhar numa área com a qual ainda não tinha tido contacto, e da qual passei a gostar bastante, e pela orientação, ânimo, disponibilidade e todos os novos conhecimentos que me proporcionou;

à Doutora Liliana Martins por me ter deixado colaborar no seu projeto tão interessante que se encontra a desenvolver, e pela ajuda no seu decorrer;

ao Professor Rúben Fernandes pela preocupação e orientação nesta etapa académica;

à Sónia pela paciência com os nomes estranhos das encomendas intermináveis, à Dona Elisabete pelo apoio na aprendizagem e ajuda com a preparação do material, e ao Doutor Ângelo, Professora Lucinda, Sara, Joana e Engenheira Carla Oliveira pelo apoio, tempos bem passados no laboratório e bom ambiente;

ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar por me receber pela segunda vez;

ao Dave por me aturar sempre;

E aos meus pais por tudo, claro.

Resumo

A pressão seletiva originada pelo uso excessivo de antimicrobianos na medicina humana e veterinária tem contribuído para a emergência de estirpes bacterianas multirresistentes, sendo os estudos mais escassos relativamente à sua presença nos animais de companhia. Porque os animais e os seus proprietários partilham o mesmo espaço habitacional, apresentando comportamentos de contacto próximo, existe uma hipótese elevada de transferência microbiana inter-espécie. Ante esta possibilidade é importante escrutinar o papel dos animais de companhia enquanto reservatórios de estirpes e de genes de resistência, bem como a sua envolvimento na disseminação de estirpes bacterianas multirresistentes. Importa também, investigar o papel das superfícies e objetos domésticos partilhados por ambos, como potenciadores deste fenómeno.

O objetivo deste trabalho foi, identificar o filogrupos e fazer a caracterização molecular dos genes que conferem resistência aos β -lactâmicos e às quinolonas, em quarenta isolados de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro alargado (ESBL), obtidas em zaragoas fecais de cães consultados no Hospital Veterinário do ICBAS-UP. Complementarmente pretendeu-se inferir sobre a partilha de clones de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. com elevadas resistências, em cinco agregados familiares (humanos e seus animais de companhia) assim como avaliar a potencial disseminação de estirpes multirresistentes no ambiente doméstico.

Previamente foram recolhidas zaragoas de fezes, pelo e mucosa oral dos animais e em alguns casos, dos seus proprietários, e ainda do ambiente doméstico. As zaragoas foram processadas e as estirpes isoladas com base em meios seletivos. Foram realizados testes de suscetibilidade antimicrobiana de modo a estabelecer o fenótipo de resistência de cada isolado. O DNA foi extraído por varias metodologias e técnicas de PCR foram utilizadas para caracterização de filogrupos (*Escherichia coli*) e identificação da espécie (*Enterococcus* spp.). A avaliação da proximidade filogenética entre isolados foi efetuada por ERIC PCR e PFGE.

No conjunto de quarenta isolados produtores de ESBL e/ou resistentes a quinolonas verificou-se que 47,5% pertenciam ao filogrupos A, havendo uma menor prevalência do filogrupos D (25,0%), B1 (17,5%), e B2 (10,0%). A frequência de resistência nestes isolados é

factualmente elevada, sendo reveladora de uma elevada pressão seletiva. Com exceção de dois isolados, os fenótipos foram justificados pela presença de β -lactamases. A frequência da presença de genes foi: 47% *bla*_{TEM}, 34% *bla*_{SHV}, 24% *bla*_{OXA}, 18% *bla*_{CTX-M-15}, 8% *bla*_{CTX-M-2}, 3% *bla*_{CTX-M-9}. Nos isolados resistentes às quinolonas verificou-se maioritariamente a presença de mutações nos genes cromossomais *gyrA* e *parC*, e em alguns casos a presença de um determinante de resistência mediado por plasmídeo – *qnrS*. Nos cinco “agregados familiares” (humanos e animais) estudados foi observada uma partilha frequente de clones de *E. coli* e *Enterococcus faecalis* com múltiplas resistências, isolados em fezes e mucosa oral de cães e gatos e fezes e mãos dos respetivos proprietários, evidenciando-se assim uma possível transferência direta entre coabitantes (agregados A, C, D, E). Ficou também comprovado com percentagens de similaridade genotípica superiores a 94% que essa disseminação também ocorre para o ambiente doméstico, envolvendo objetos dos animais e de uso comum (agregados A, E). Os resultados obtidos reforçam a necessidade de um uso prudente dos antimicrobianos, pois elevados padrões de resistências terão um impacto não só na qualidade de vida dos animais mas também na saúde humana. Adicionalmente importa sensibilizar os proprietários para a necessidade de uma maior vigilância relativamente às formas de interação com os animais, bem como para a adoção de medidas higiénicas cautelares após essa mesma interação.

Palavras – chave: animais de companhia, resistências antimicrobianas, β -lactâmicos, ESBL, quinolonas, transferência bacteriana

Abstract

The selective pressure caused by the excessive use of antimicrobials, both in human and veterinary medicine, has triggered the emergence of multidrug-resistant bacterial strains. Studies are relatively scarce to what concerns to the presence of antimicrobial-resistant bacteria in companion animals. Since animals and their owners share the same living space, with close contact behaviors, there is a chance of inter-species microbial transfer. Taking into account this hypothesis, it is important to scrutinize the role of companion animals as reservoir of resistance genes, as well as their involvement in the dissemination of multidrug-resistant bacteria. It is also important to investigate the role of surfaces and objects shared by both animals and humans, as potential enhancers of this phenomenon.

The aim of this study was to identify the phylogenetic group and the presence of genes that confer resistance to β -lactams and to quinolones, in forty ESBL producing *Escherichia coli*, obtained from fecal swabs collected from dogs that had appointments in the Veterinary Hospital of ICBAS-UP. In addition, it was sought to infer about the sharing of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. clones with high resistances, in five households (humans and their pets) as well as observe their dissemination across the domestic environment.

Prior to this work, swabs from feces, hair and oral mucosa were collected from the animals, and in some cases from their owners, as well as from the domestic environment. Swabs were processed and strains were isolated by using selective media. Antimicrobial susceptibility tests were performed to establish the resistance phenotype of each isolate. DNA was extracted by various methods, and PCR techniques were used to characterize phylogenetic groups (*Escherichia coli*), and to species identification (*Enterococcus* spp.). ERIC PCR and PFGE were used to study the clonal proximity between isolates.

In the group of forty ESBL and fluoroquinolone resistant isolates, it was verified that 47,5% belonged to the phylogenetic group A, followed by 25,0% in the phylogenetic group D, B1 (17,5%) and B2 (10,0%). The resistance frequency of those isolates is indubitably high, showing an occurring selective pressure. Except for two isolates, the resistance phenotypes were justified by the presence of β -lactamases. The frequency of identified genes was: 47%

*bla*_{TEM}, 34% *bla*_{SHV}, 24% *bla*_{OXA}, 18% *bla*_{CTX-M-15}, 8% *bla*_{CTX-M-2} and 3% *bla*_{CTX-M-9}. In the quinolones resistant isolates, there was a major presence of chromosomal genes mutations (in *gyrA* and *parC*), and in some cases there was a plasmid mediated quinolone resistance (*qnrS* gene). In the five households, it was observed the sharing of *E. coli* and *Enterococcus faecalis* clones with multiple resistances, among cats and dogs' feces and oral mucosa, and their respective owners hands and feces, being evident that there was a possible direct transmission between cohabitants (household: A, C, D, E). It has also been demonstrated with over 94% of similarity in the genotypic profile that this dissemination also occurs in the home environment, with transference to common use objects (household: A, E). Regarding these results, it is easily noticeable that it is necessary to use antibiotics cautiously since high resistance levels will have an impact not only on pet's quality of life, but also on human health. Additionally, it's important to make the owners aware of the need of greater vigilance on how they interact with the animals, as well as for the adoption of precautionary hygienic measures after that interaction.

Keywords: companion animals, antimicrobial resistances, β -lactam, ESBL, quinolones, bacterial clone sharing

Índice

Resumo	iv
Índice de abreviaturas	x
Índice de figuras	xii
Índice de quadros	xiv
Índice de anexos	xv
Prefácio e objetivos	1
Capítulo I – Introdução	3
1.1. <i>Escherichia coli</i>	3
1.2. Antibióticos e resistências antimicrobianas.....	8
1.2.1. Antibióticos β -lactâmicos e β -lactamases	11
1.2.2. Quinolonas.....	19
1.3. <i>Enterococcus</i> spp.	22
1.4. Transferência bacteriana entre espécies	27
1.5. Técnicas de genotipagem bacteriana	34
1.5.1. ERIC PCR	34
1.5.2. Electroforese em campo pulsado (PFGE)	36
Capítulo II – Materiais e métodos	42
2.1. Seleção e recolha de amostras	42
2.2. Processamento das amostras após recolha.....	43
2.3. Isolamento de colónias <i>Enterococcus</i> spp.....	44
2.4. Isolamento de colónias <i>Escherichia coli</i>	45
2.5. Teste de suscetibilidade antimicrobiana	45
2.6. Extração de DNA de bactérias gram-positivo	47
2.7. Extração de DNA de bactérias gram-negativo	49
2.8. Identificação de filogrupos de <i>Escherichia coli</i> por multiplex PCR.....	52

2.9. Identificação de espécies de <i>Enterococcus</i> por multiplex PCR	54
2.10. Caracterização molecular dos genes que codificam resistências a β -lactâmicos por multiplex PCR	56
2.11. Detecção de genes de resistência a quinolonas	59
2.12. ERIC PCR	62
2.13. Electroforese em campo pulsado (PFGE) para <i>Escherichia coli</i>	63
Capítulo III – Resultados e discussão	69
3.1. Caracterização molecular das resistências aos β -lactâmicos e às quinolonas e determinação dos filogrupos	69
3.1.1. Determinação dos filogrupos.....	69
3.1.2. Caracterização molecular das resistências aos β - lactâmicos e às quinolonas	70
3.2. Estudos de filogenia em isolados obtidos a partir de animais de companhia, coabitantes humanos e ambiente doméstico.....	76
3.2.1. Agregado A	76
3.2.2. Agregado B.....	83
3.2.3. Agregado C.....	85
3.2.4. Agregado D	87
3.2.5. Agregado E.....	89
Conclusão	101
Perspetivas futuras	107
Referências Bibliográficas	108
Anexos	121

Índice de abreviaturas

A/E - *Attaching-effacing*

AC - Ácido clavulânico

AFLP - *Amplified fragment length polymorphism*

AK - Amicacina

AMC - Amoxicilina/ácido clavulânico

AMP - Ampicilina

APT - Água peptonada tamponada (*Buffered Peptone Water*)

ATM - Aztreonamo

AZM - Azitromicina

C - Cloranfenicol

CAZ - Ceftazidima

CIP - Ciprofloxacina

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CN - Gentamicina

CTX - Cefotaxima

DAEC - *E. coli* de aparência difusa

DEC - *E. coli* diarreiogénicas

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos

E - Eritromicina

EAEC - *E. coli* Enteroagregativa

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EIEC - *E. coli* Enteroinvasiva

EHEC - *E. coli* Enterohemorrágica

EPEC - *E. coli* Enteropatogénica

ERIC - *Enterobacterial repetitive intergenic consensus*

ESBL - *Extended spectrum β -lactamase* – β -lactamases de espectro alargado

ETEC - *E. coli* Enterotoxigénica

F - Nitrofurantoína

FOX - Cefoxitina

IPM - Imipenem

K - Kanamicina

KAA - *Kanamycin Aesculin Azide Agar*

KF - Cefalotina

LMP - *Low melting point*

MDR - *Multidrug-resistance*

MH - *Müeller Hinton*

MIC - Concentração mínima inibitória

MLEE - *Multilocus enzyme electrophoresis*
MLST - *Multilocus sequence typing*
MRSA - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*
NA - Ácido nalidíxico
NaCl - Cloreto de sódio
PBP - *Penicillin-Binding-Proteins*
PCR - *Polimerase chain reaction*
PFGE - *Pulsed field gel electrophoresis*
PMSF - *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
PMQR - Determinantes de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos
QD - Quinupristina-dalfopristina
QRDR - Região determinante da resistência às quinolonas
RD - Rifampicina
REP-PCR - *Repetitive sequence-based polymerase chain reaction*
RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*
S - Estreptomicina
SB - *Slanetz and Bartley Agar*
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SET - Solução Sódio-Ácido etilenodiaminotetracético-Tris
STEC - *Shiga-toxigenic E. coli*
SXT - Sulfametoxazol/trimetoprima
TBE - Tampão Tris/Borato/EDTA
TBX - *Tryptone Bile X-glucuronide Agar*
TEC - Teicoplanina
TE - Tetraciclina
TSI - *Triple Sugar Iron Agar*
TOB - Tobramicina
VAN - Vancomicina
VRE - *Vancomycin-resistant Enterococcus*
VTEC - *Verotoxigenic E. coli*
ITU - Infecção do trato urinário
UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*
UV- Ultra-violeta

Índice de Figuras

Figura 1 - Árvore dicotômica para determinação dos grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> , criada com base nos resultados das amplificações por PCR dos genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> e do fragmento de DNA TspE4.C2	7
Figura 2 - Alinhamento das sequências dos primers ERIC em relação à sequência <i>consensus</i> ERIC publicada. (retirado de Versalovic et al., 1991).	35
Figura 3 - Esquema exemplificativo de padrões de PFGE para interpretação de eventos genéticos que alteram o número de bandas obtidas resultantes da restrição enzimática. Poços 1 e 2 representam DNA cromossômico com padrões indistinguíveis, sendo consideradas linhagens epidêmicas. Poço 3- uma das bandas recebeu uma inserção e aumentou de tamanho, Poço 4 - uma das bandas sofreu uma deleção e diminuiu de tamanho, Poço 5- uma mutação criou um sítio de restrição, aumentando o número de bandas, Poço 6 – uma mutação alterou um sítio de restrição e dois fragmentos foram perdidos, surgindo um de maior tamanho, Poço 7 – DNA cromossômico com padrão diferentes, não estando relacionado com o surto epidêmico (retirado de Adolfo, 2005).....	40
Figura 4 - Imagem representativa das corridas de electroforese realizadas para confirmação da extração de DNA, observando-se uma banda de elevado peso molecular correspondente ao DNA genômico bacteriano, e duas bandas representantes do RNA ribossomal. Electroforese em gel de agarose 1,5%, 150V, 20min. Gel corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL).	48
Figura 5 - Imagem representativa das corridas de electroforese para confirmação da extração de DNA, observando-se a banda de elevado peso molecular correspondente ao DNA genômico bacteriano, extraído termicamente. Electroforese em gel de agarose 1,5%, 150V, 20min. Gel corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL)	51
Figura 6 - Imagem representativa das corridas de electroforese para confirmação da extração de DNA, observando-se a banda de elevado peso molecular correspondente ao DNA genômico bacteriano extraído com InstaGene Matrix [®] . Electroforese em gel de agarose 1,5%, 150V, 20min. Gel corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL).	51
Figura 7 - Imagem obtida neste trabalho e representativa dos possíveis conjuntos de amplificação obtidos por multiplex PCR das sequências que caracterizam os diferentes filogrupos. Poço 1 e 2 – grupo A, poço 3 – grupo B1, poço 4 e 5 - grupo D, poço 6 e 7 – grupo B2, M – marcador de peso molecular.	53
Figura 8 - Representação esquemática do vidro forrado com parafilme e da disposição das lâminas que permitem a formação dos <i>plugs</i> de agarose com suspensão bacteriana, para catorze amostras.	65
Figura 9 - Sequência de reconhecimento da enzima de restrição XbaI. Gene com origem em <i>Xanthomonas badrii</i>	66
Figura 10 - Padrão de bandas visualizadas na corrida de electroforese dos produtos amplificados por ERIC PCR, dos isolados selecionados para estudo do agregado A e respetivo filogrupo. Dendrograma obtido com base no agrupamento UPGMA e análise de similaridade com cálculo do coeficiente de Dice. A vermelho estão realçados alguns conjuntos de isolados com similaridades superiores a 94% e com relevância para a continuação do estudo. A negrito estão realçados os isolados que foram selecionados para prosseguir o estudo de genotipagem por PFGE.	79
Figura 11 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese em campo pulsado com os isolados selecionados para o estudo do agregado A e respetivo filogrupo. Dendrograma obtido com base no agrupamento UPGMA e análise de similaridade com cálculo do coeficiente de Dice. A vermelho estão realçados alguns conjuntos de isolados com similaridades superiores a 94%.	80
Figura 12 - Imagem obtida por PFGE que demonstra isolados que inicialmente se apresentavam como incapazes de serem tipáveis por PFGE (A), e posteriormente, com mudança do protocolo, observação de bandas resultantes da digestão do DNA e corrida electroforética em campo pulsado (B).	83

Figura 13 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese dos produtos da reação de ERIC PCR (A) e bandas resultantes da digestão do DNA bacteriano com a enzima XbaI com corrida em electroforese em campo pulsado (B), dos isolados estudados no agregado B e respetivo filogruppo. Dendrograma e percentagens de similaridade obtidos com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice.	84
Figura 14 - Imagem obtida neste trabalho e demonstrativa da amplificação resultante do PCR para identificação de espécie de <i>Enterococcus</i> . Observa-se em todas as amostras uma banda de 360pb que corresponde à espécie <i>E. faecalis</i>	86
Figura 15 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese dos produtos da reação de ERIC PCR, dos isolados do agregado C. Dendrograma e percentagens de similaridade obtidos com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice.	86
Figura 16 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese dos produtos da reação de ERIC PCR dos isolados estudados no agregado D. Dendrograma e percentagens de similaridade obtidos com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice.	88
Figura 17 - Imagem obtida neste trabalho correspondente à corrida de electroforese do produto do multiplex PCR para determinação dos grupos filogenéticos de algumas estripes de <i>E.coli</i> do estudo do agregado E, Verifica-se a amplificação constante de uma banda de 211pb correspondente ao gene <i>YjaA</i> , demonstrando a igualdade dos filogrupos (A), excetuando a ultima amostra correspondente às fezes da proprietária, onde se verifica a presença de três bandas correspondendo ao filogrupos B2.	90
Figura 18 - Perfil genético obtido na corrida de electroforese em campo pulsado, dos isolados pertencentes ao agregado E e respetivo filogruppo. Dendrograma e percentagens de similaridade obtidos com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice. A vermelho estão realçados alguns conjuntos de isolados com similaridades superiores a 94%.	92
Figura 19 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese dos produtos da reação de ERIC PCR. Dendrograma e percentagens de similaridade obtidos com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice. A vermelho estão realçados alguns conjuntos de isolados com similaridades superiores a 94%.	94
Figura 20 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese dos produtos da reação de ERIC PCR do conjunto de isolados que apresentam o primeiro fenótipo. Dendrograma e percentagens de similaridade obtidos com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice.	96
Figura 21 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese dos produtos da reação de ERIC PCR dos conjuntos de isolados de <i>Enterococcus</i> pertencentes ao 2º, 3º e 4º fenótipos. Dendrograma e percentagens de similaridade obtidos com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice.	97
Figura 22 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese dos produtos resultantes da reação de ERIC PCR com os isolados recolhidos dos vários locais de amostragem dos quatro conjuntos de fenótipos de <i>Enterococcus faecalis</i> . Dendrograma obtido com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice. A vermelho estão realçados os conjuntos de isolados com similaridade igual ou superior a 94%.	99
Gráfico I - Proporção de resistência a cefalosporinas de 3ª geração (A) e quinolonas (B) em <i>E. coli</i> em alguns países, em 2011. Em cinza estão países que não foram incluídos ou reportaram menos de 10 isolados. (retirado de http://ecdc.europa.eu/).	21
Gráfico II - Proporção de resistência à vancomicina em <i>Enterococcus faecium</i> (A) e <i>faecalis</i> (B) em alguns países, em 2011. Em cinza estão países que não foram incluídos ou reportaram menos de 10 isolados. (retirado de http://ecdc.europa.eu/).	27

Índice de Quadros

Quadro I - Subtipos de antibióticos β -lactâmicos (adaptado de www.medscape.com)	13
Quadro II - Classificação das β -lactamases segundo Ambler (1980), exemplos enzimáticos mais associados e fenótipos de resistência (adaptado de Pfeifer, Cullik, & Witte, 2010)	19
Quadro III - Presença de β -lactamases em cães e gatos doentes e saudáveis em diferentes trabalhos (retirado de Smet et al., 2010). Outro quadro mais detalhado apode ser encontrado no trabalho de Ewers, Grobbel, Bethe & Sebastian, 2011	33
Quadro IV - Exemplos de enzimas de restrição utilizadas para análise genotípica de DNA bacteriano por PFGE.	41
Quadro V - Primers utilizados, respetivas sequências e tamanho dos amplicões obtidos, para determinação dos filogrupos das estirpes de <i>E. coli</i>	53
Quadro VI - Divisão por grupos das reações de multiplex PCR e respetivos primers utilizados para a determinação das diferentes espécies de <i>Enterococcus</i> , sequências nucleotídicas e tamanho dos amplicões obtidos.	55
Quadro VII - Divisão por grupos das reações de PCR multiplex, utilizados para a determinação molecular de genes de β -lactamases e respetivas sequências nucleotídicas, tamanho dos amplicões obtidos, e concentração de primer a utilizar. Y= T ou C; R= A ou G; S= G ou C; D= A ou G or T. F= <i>forward</i> , R= <i>reverse</i>	58
Quadro VIII - Primers utilizados para a determinação molecular dos genes de resistência às quinolonas, tanto cromossomal como mediada por plasmídeos, respetivas sequências nucleotídicas e tamanho dos amplicões obtidos. M = A or C; H = A or C or T; Y=C or T. F= <i>forward</i> , R= <i>reverse</i>	61
Quadro IX - Primers utilizados e respetivas sequências, utilizados para ERIC PCR.	63
Quadro X - Frequência de resistências observadas nos testes de suscetibilidade realizados nas quarenta <i>E. coli</i> selecionadas de entre os isolados de amostras fecais de cães selecionados aleatoriamente no Hospital Veterinário UPVET. (ver lista de abreviaturas na página xi)	70
Quadro XI - Diferentes isolados de <i>E. coli</i> , numerados de 1 a 40, com respetivo fenótipo de resistência, filogrupo e genes de resistência (β -lactâmicos e quinolonas) encontrados. + representa a presença do gene e – a sua ausência. Todos os outros genes listados no Capítulo II- Materiais e Métodos foram pesquisados mas não foram encontrados. Nos genes cromossomais <i>gyrA</i> e <i>parC</i> listaram-se as mutações verificadas identificando o novo aminoácido e a posição de mutação. (Leu, leucina; Asn, asparargina; Tyr, tirosina; Gly, glicina; Val, valina; Ile, isoleucina, Thr, tirosina; Arg, arginina; Lys, lisina. Ver lista de abreviaturas de antimicrobianos na página xi)	73
Quadro XII - Mutações verificadas demonstrando-se a substituição por um novo aminoácido e a posição de mutação e a sua prevalência no conjunto de isolados mencionado. Todos os outros genes listados no Capítulo II- Materiais e métodos foram pesquisados mas não foram encontrados. (Leu, leucina; Asn, asparargina; Tyr, tirosina; Gly, glicina; Val, valina; Ile, isoleucina, Thr, tirosina; Arg, arginina; Lys, lisina. Ver lista de abreviaturas de antimicrobianos na página xi).....	75
Quadro XIII - Fenótipos de resistência antimicrobiana observados nos diferentes isolados de <i>E. coli</i> durante o estudo do agregado A. Quadro cedido pelos colaboradores do laboratório que procederam a esta parte do trabalho em questão (ver lista de abreviaturas na página xi)	77
Quadro XIV - Fenótipos de resistência similares verificados em vários isolados de <i>E. coli</i> com origens diferentes, destacando-se o isolado bacteriano da proprietária que apresenta apenas duas resistências (ver lista de abreviaturas na página xi).....	90
Quadro XV - Distinção de quatro fenótipos de resistência. Cada fenótipo corresponde a um grupo de isolados de <i>Enterococcus</i> com variadas origens dentro do agregado E (ver lista de abreviaturas na página xi).....	95

Índice de anexos

Anexo 1 - Esquema de classificação de β -lactamases segundo dois autores (adaptado de www.medscape.com).	120
Anexo 2 - Exemplos de β -lactamases e sua distribuição segundo o grupo funcional. Número de variantes de enzimas descritas até 2010 (adaptado de Bush & Jacoby, 2010).	121

Prefácio e objetivos

Esta dissertação apresenta-se dividida em duas frentes de trabalho de investigação, as quais apresentam objetivos diferentes manifestando no entanto uma meta final coincidente.

Num primeiro trabalho, será continuado um estudo de vigilância epidemiológica, que pretende estabelecer a prevalência de resistências a antimicrobianos em *Escherichia coli* isoladas em fezes de animais de companhia. As amostras foram recolhidas por colaboradores do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS-UP, Porto, Portugal) em cem animais selecionados aleatoriamente, que por motivo de doença ou de rotina, se deslocaram à consulta no Hospital Veterinário de Animais de Companhia do ICBAS – UPVET. Selecionaram-se quarenta isolados de *E. coli* produtoras de ESBL, com os quais se pretende atingir os seguintes objetivos: i) caracterização molecular das resistências aos β -lactâmicos e às quinolonas, através da pesquisa dos genes que suportam essas resistências ii) o estudo da filogenia desses isolados, efetuando uma determinação dos seus filogrupos.

Numa outra vertente deste trabalho de investigação pretendeu-se dar continuidade a um estudo epidemiológico sobre partilha de estirpes bacterianas, através da avaliação de relações de proximidade clonal, por comparação genotípica, de isolados bacterianos (*Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.) multirresistentes e/ou com perfis de resistência e características fenotípicas similares, isolados em animais de companhia (cães e gatos) e seus respetivos proprietários, incluindo também os isolados presentes em objetos domésticos de uso comum. Para tal iii) procedeu-se à tipagem genética por ERIC-PCR e iv) PFGE. Adicionalmente, v) determinou-se os filogrupos dos isolados de *E.coli* e identificou-se a espécie de *Enterococcus*. Pretendeu-se ainda, vii) relacionar os resultados da partilha de estirpes bacterianas entre espécies, com informações recolhidas, através de um questionário, sobre os diversos elementos do agregado doméstico, suas inter-relações e hábitos assim como história clínica pregressa com enfoque em terapias antimicrobianas.

Ambos os trabalhos pretendem contribuir para o estudo do impacto das terapias antimicrobianas nos animais de companhia, caracterizando molecularmente os genes de resistência e procurando evidências da disseminação entre coabitantes, de estirpes multirresistentes, através da transferência direta de clones bacterianos, ou por aquisição indireta devido à sua disseminação em superfícies domésticas de uso comum. A transferência

de estirpes resistentes pode originar, quer uma colonização permanente (passando o hospedeiro a adquirir essa estirpe) quer transitoriamente (contribuindo com a transferência de genes de resistência para a microbiota sensível do hospedeiro). Acontecimentos que realçam a necessidade da prescrição antimicrobiana se limitar aos casos estritamente necessários, assim como do estabelecimento de cuidados necessários para evitar a transmissão bacteriana entre humanos e animais. Caso contrário, estas situações poderão potenciar a existência de cada vez mais portadores de bactérias multirresistentes, sem história pregressa de tratamentos antimicrobianos, tratando-se assim de um problema de saúde pública.

Capítulo I – Introdução

1.1. *Escherichia coli*

Escherichia é um Género pertencente à Família *Enterobacteriaceae*. A espécie *Escherichia coli* (*E. coli*) apresenta as seguintes características fenotípicas: bacilos gram-negativo, anaeróbios facultativos, oxidase negativa, catálase positiva, fermentadores de lactose, sacarose e glicose (com a produção de gás), podendo ou não apresentar motilidade e sendo incapaz de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono, em virtude da ausência da enzima citrase. Pode ainda ser caracterizada conforme o serotipo e serogrupo, de acordo com a caracterização dos antígenos somáticos “O” e flagelares “H” para o serotipo, ou só pela determinação do antígeno O, que define o serogrupo. *E. coli* é um habitante comensal, inofensivo e importante, do trato intestinal de humanos e animais, no entanto, algumas estirpes são conhecidas por serem capazes de causar doença que em determinados casos pode conduzir à morte. As patologias associadas à *E.coli*, nomeadamente diarreia e várias doenças extraintestinais como cistite, septicémia ou até meningite, estão correlacionadas com a presença de vários genes responsáveis pela codificação de características que lhe conferem virulência. No entanto, a presença e manutenção de tantos fatores de virulência afigura-se contraditório perante o princípio de estes conferirem poucas vantagens seletivas, o que leva à convicção de que a maioria dos fatores de virulência podem ser necessários para a colonização de nichos, de onde não resulte obrigatoriamente doença, ou para a disseminação para novos hospedeiros. Assim, pensa-se que muitas infeções causadas por agentes patogénicos facultativos como a *E. coli* ocorram por acidente (Le Gall et al., 2007). Os fatores de virulência presentes em estirpes patogénicas de *E. coli* podem ser muito diversos, e.g - fatores de adesão (adesinas), toxinas (hemolisina), lipopolisacarídeos, sistemas de aquisição de ferro, mecanismos de resistência e invasinas. Nas estirpes de *E. coli* é considerada a existência de uma principal estrutura genética clonal, com um nível baixo de recombinação (Desjardins, Picard, Kaltenböck, Elion, & Denamur, 1995), e um *pool* genético variável. *E coli* é ainda um importante microrganismo indicador da contaminação fecal em ambientes aquáticos. Em muitos casos, um aumento na quantidade de *E. coli* corresponde ao risco aumentado de

doenças gastrointestinais causadas por outros microrganismos entéricos patogénicos como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni* (Savichtcheva & Okabe, 2006).

As estirpes de *E. coli* que causam infeções intestinais diarreiogénicas (DEC) são classificadas como: *E. coli* Enterotoxigénicas (ETEC), Enterohemorrágicas (EHEC), Enteropatogénicas (EPEC), Enteroagregativas (EAEC), *E. coli* de aparência difusa (DAEC) e Enteroinvasivas (EIEC) (Kaper, Nataro, & Mobley, 2004). EPEC são caracterizadas pela presença de lesões *attaching-effacing* (A/E) no íleo, com estimulação de alterações no citoesqueleto nas células epiteliais. EHEC está associada com colite hemorrágica, causando também lesões A/E. Estas estirpes podem também ser chamadas de STEC (*Shiga-toxigenic E. coli*) ou VTEC (*Verotoxigenic E. coli*). ETEC é a principal causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento e está associada com enterotoxinas *heat-labile* (LT) e *heat-stable* (ST). Outras estirpes causadoras de diarreia foram definidas, EAEC e DAEC. EIEC partilham um fenótipo de invasão similar com *Shigella*, mas com sintomas mais moderados. *E. coli* extraintestinais patogénicas (ExPEC) estão associadas com algumas condições clínicas como infeção do trato urinário (ITU) (Rijavec et al., 2006).

A Filogenia é o estudo da proximidade evolutiva de entre os vários grupos de organismos. A análise filogenética de *E. coli* permitiu a sua classificação em quatro grupos filogenéticos, nomeadamente A, B1, B2 e D (Herzer, Inouye, Inouye, & Whittam, 1990). Os grupos A e B1 agregam estirpes comensais, enquanto que a maioria dos isolados enteropatogénicos estão atribuídos ao grupo D. Já o grupo B2 está associado com patótipos extraintestinais (Johnson, van der Schee, Kuskowski, Goessens, & van Belkum, 2002). Zhang, Foxman, & Marrs, 2002, observaram que este grupo (B2) era muito frequente entre isolados retais de mulheres saudáveis (48%) mas também entre *E. coli* extraintestinal, nomeadamente, isoladas em mulheres com ITU - 69%. Em concordância, com exceção de algumas *E. coli* aderentes e enteropatogénicas, as causadoras de diarreia não são estirpes B2 (Wirth et al., 2006), sendo muitas vezes isoladas em fezes de portadores assintomáticos (Escobar-Páramo et al., 2006). Alguns casos reportados demonstram que estirpes pertencentes a grupos A e B1 podem também causar doenças extraintestinais (Rijavec, Müller-Premru, Zakotnik, & Zgur-Bertok, 2008). Não é claro se todas as estirpes de *E. coli* presentes no trato intestinal de indivíduos saudáveis a uma determinada altura devem ser consideradas comensais independentemente do seu *background* filogenético ou se só apenas os isolados pertencentes

aos grupos A e B1 (Zhang et al., 2002). Do mesmo modo, não é claro se isolados pertencentes ao grupo A e B1 isolados de infeções urinárias devem ser consideradas como patogénicos, ou comensais que produzem infeção em hospedeiros comprometidos (Sabaté, Moreno, Pérez, Andreu, & Prats, 2006). De acordo com Lecointre, Rachdi, Darlu, & Denamur, 1998, os grupos A e B1 são “irmãos” que se separaram tardiamente, enquanto estudos recentes demonstram que o grupo filogenético B2 é incluído num ramo ancestral (Escobar-Páramo, Sabbagh, et al., 2004). Estirpes destes grupos diferem em características fenotípicas e genotípicas incluindo a capacidade de usar certos açúcares, perfis de resistências a antibióticos, taxas de crescimento diferentes a certas temperaturas (Touchon et al., 2009) e ainda apresentam capacidade de colonizar diferentes nichos ecológicos. Apresentam também, características de evolução diferentes, assim como diferente propensão de causar doença (Escobar-Páramo et al., 2006). Variações no *background* genético e a presença ou ausência de fatores de virulência especializados podem contribuir em parte para a dualidade comensalismo-*vs*-patogenicidade de *E. coli* (Le Gall et al., 2007). A distribuição da variedade de fatores de virulência que se pensa estarem envolvidos na capacidade de uma estirpe causar diversas doenças também varia com a distribuição das estirpes por estes grupos filogenéticos (Escobar-Páramo, Clermont, et al., 2004), o que indica um papel do *background* genético na expressão de virulência em *E. coli*. Uma variedade de fatores de virulência associados com infeções extraintestinais estão distribuídos entre as estirpes dos quatro grupos, onde as do grupo B2 (maioritariamente) e D apresentam maior frequência e diversidade de fatores (Da Silva & Mendonça, 2012). A maioria das estirpes de *E. coli* responsáveis por infeções do trato urinário e outras infeções extraintestinais, pertencem ao grupo B2, e também, embora em menor extensão ao grupo D (Picard et al., 1999). Estes grupos são mais isolados em locais extraintestinais, tornando-se um problema de saúde pública, comparando com os grupos A e B1 (Johnson, Delavari, Kuskowski, & Stell, 2001). Estes grupos filogenéticos variam ainda no tamanho do genoma, sendo que as estirpes incluídas nos grupos A e B1 tendem a ter genomas mais pequenos que as pertencentes aos grupos B2 e D (Bergthorsson & Ochman, 1998). Os grupos B2 e D são ainda menos frequentes no ambiente (Walk, Alm, Calhoun, Mladonicky, & Whittam, 2007) que os A e B1 (Gordon & Cowling, 2003). Alguns autores analisaram a distribuição dos principais grupos filogenéticos das estirpes isoladas em fezes de humanos e animais, observando um padrão que permite caracterizar uma distribuição de filogrupos

conforme o tipo de animal, a dieta, o peso, o clima e a domesticação (Gordon & Cowling, 2003; Baldy-Chudzik, Mackiewicz, & Stosik, 2008). Esta observação pode contribuir e permitir a identificação da fonte de contaminação fecal do ambiente (Carlos et al., 2010). Algumas técnicas que permitiram a caracterização do grupo filogenético foram por exemplo a ribotipagem, *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) e *Multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE), que são, na maioria, técnicas complexas, dispendiosas e demoradas. Clermont e colaboradores, em 2000, descreveram uma análise filogenética com base em três marcadores genéticos, utilizando uma reação de multiplex PCR. Clermont observou que certos genes ou fragmentos de DNA pareciam ser marcadores específicos de grupos filogenéticos. Assim, três marcadores candidatos foram estudados. Os alvos genéticos selecionados foram: *chuA* – um gene necessário para o transporte do grupo heme em *E. coli* enterohemorrágica (O157:H7) (Bonacorsi et al., 2000), *yjaA* – um gene identificado na sequenciação do genoma de *E. coli* K12 (Blattner et al., 1997) e TspE4.C2 – um fragmento de DNA anónimo (Bonacorsi et al., 2000). De acordo com os seus resultados, Clermont e colaboradores constataram que o gene *chuA* estava presente em todas as estirpes pertencentes ao grupo B2 e D e estava ausente em todas as estirpes pertencentes aos grupos A e B1. Isto permitiu a separação dos grupos B2 e D dos grupos A e B1. Da mesma maneira, o gene *yjaA* permitiu a discriminação entre o grupo B2 e D. Por fim, TspE4.C2 estava presente em todos menos B1 e A. *ChuA* representa assim o marcador filogenético para isolados de *E. coli* extraintestinais, *yjaA* e TspE4.C2 representam o marcador filogenético para isolados intestinais de *E. coli* (Abdul-razzaq & Abdul-lateef, 2011). Os resultados destas três amplificações por PCR permitiram o estabelecimento de uma árvore dicotómica para o agrupamento filogenético (Figura 1). Este método foi considerado satisfatório e tem sido utilizado em vários trabalhos. Gordon, Clermont, Tolley, & Denamur, 2008 avaliaram a fiabilidade deste procedimento, por comparação com uma abordagem por MLST, e verificaram que 80-85% da atribuição dos filogrupos pelo método de Clermont estava correta. No entanto, a exatidão dependia do genótipo definido por Clermont. Assim, estirpes que apresentam um genótipo de Clermont consistente com filogrupos B1 e B2 estão atribuídos corretamente 95% das vezes. Estirpes que não produzem nenhuma amplificação por PCR de acordo com este método são raramente, pela confirmação de Gordon, membros do filogrupos A, e estirpes com tal genótipo não deviam ser atribuídas a nenhum filogrupos.

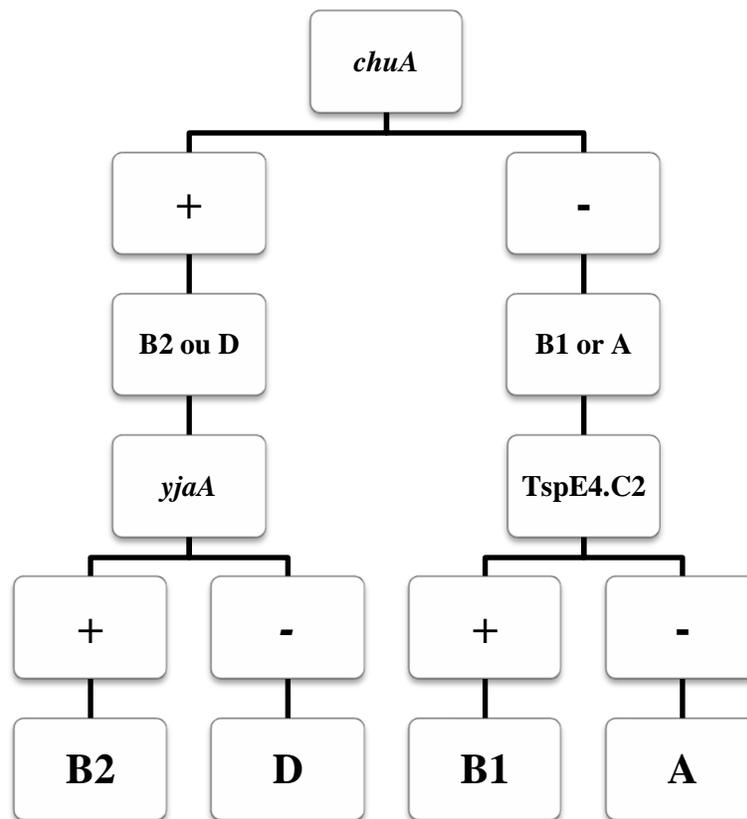


Figura 1 – Árvore dicotômica para determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli*, criada com base nos resultados das amplificações por PCR dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TspE4.C2

Pouca informação está disponível sobre o gene *yjaA* permitindo pouca especulação na sua história evolutiva. Já segundo Wyckoff et al., 1998, e o trabalho de Clermont et al., 2000, sugerem que *chuA* foi adquirido pelos grupos irmãos B2 e D logo após a sua emergência, em vez de estar presente num ancestral comum e subsequentemente ser perdido pelos grupos A e B1. Esta técnica pode ser útil na prática clínica, por ser um método rápido e não dispendioso e permitir o estabelecimento da ligação entre grupos filogenéticos e virulência. Para aumentar a capacidade discriminatória da análise das populações de *E. coli*, foi proposto a utilização de subgrupos A0, A1, B1, B2₂, B2₃, D1, D2, que são determinados pela combinação dos marcadores genéticos (Escobar-Páramo et al., 2006).

1.2. Antibióticos e resistências antimicrobianas

Desde que Alexander Fleming em 1928 reparou nas propriedades antibacterianas da penicilina, e em 1940 esta ser testada, passando esse momento a ser considerado como a altura da descoberta do primeiro antibiótico β -lactâmico, muitos outros foram pesquisados, desenvolvidos e largamente utilizados. Os antimicrobianos consistem em qualquer tipo de composto com propriedades inibitórias parciais ou totais para o crescimento de um microrganismo. A utilização do termo antibiótico implica que a fonte do agente antimicrobiano é natural. Recentemente muitos agentes antimicrobianos derivam de síntese química (quimioterápicos). Existem várias teorias para a existência destes compostos, considerando-se que estes podem ser metabolitos utilizados como defesa contra outros microrganismos que habitem o mesmo espaço e compitam por nutrientes, apresentarem funções de mensageiros químicos, ou ainda moduladores de funções metabólicas em comunidades microbianas, sendo assim importantes para comunicação entre células funcionando como moléculas sinalizadoras em ecossistemas antimicrobianos (Fernandes, Amador, & Prudêncio, 2013). Existem vários alvos para a ação dos antibióticos. Estes podem atuar a nível da inibição da síntese da parede celular, enfraquecimento da membrana citoplasmática, inibição da síntese de ácidos nucleicos, inibição da síntese proteica, e perturbação o metabolismo bacteriano. No entanto também existem mecanismos pelos quais as bactérias podem escapar à ação dos antimicrobianos, como alteração do alvo antimicrobiano por perda de afinidade, redução na passagem deste de modo a menor concentração atingir o alvo através da diminuição da permeabilidade ou mutação em porinas, expulsão do antimicrobiano por mecanismos de efluxo, ou ainda, o mais estudado, a presença de enzimas que destruam as moléculas responsáveis pela ação antimicrobiana (Fernandes et al., 2013). Os genes que codificam esses mecanismos são chamados de genes de resistência a antimicrobianos, que se pensa que já existiam em alguns microrganismos muito antes da nossa descoberta e sobre-utilização destes compostos. Acredita-se que estes genes que codificam para mecanismos de proteção sejam em parte característicos dos microrganismos produtores de antimicrobianos. No entanto, o facto de existirem em microrganismos não produtores de antibióticos, pode sugerir a sua envolvimento em alguns metabolismos ou serem moléculas remanescentes sem um papel claro no metabolismo bacteriano. A sua atividade contra

antibióticos pode ter sido inicialmente um efeito secundário da sua atividade fisiológica (Alonso, Sanchez, & Martinez, 2001). Vários autores sugerem hipóteses para funções anteriores de vários genes que codificam enzimas que atualmente contribuem para a inativação de antimicrobianos (como a possibilidade de estarem relacionadas com o metabolismo da parede celular), assim como de canais de transporte que expulsam o antibiótico, que anteriormente seriam, por exemplo, utilizados para bombear compostos como sais biliares para o exterior (Alonso et al., 2001). Num passado recente, mutações em genes de alvos de antimicrobianos eram consideradas a causa principal da resistência, no entanto rapidamente ficou evidente que a aquisição de determinantes de resistência por transferência horizontal de genes apresentava um papel principal no desenvolvimento e disseminação de resistências entre bactérias. Microrganismos poderiam sofrer inicialmente uma seleção por apresentarem esses compostos de modo a cobrir as funções mencionadas anteriormente. No entanto, assim que esses genes se encontram noutros hospedeiros, fora do seu contexto fisiológico, e a presença constante de antimicrobianos no seu habitat origina uma pressão seletiva, passam as bactérias a sofrer uma seleção conforme a presença de genes que se comportem como genes de resistência. É assim um efeito secundário inevitável do uso de antibióticos, a emergência e propagação de bactérias resistentes. Após a introdução de um antibiótico, o nível de resistência aumenta, não só nas bactérias patogénicas mas também nas comensais, que passam a constituir um reservatório de genes de resistências, podendo transferi-los para outros microrganismos patogénicos e mais virulentos. As bactérias podem adquirir genes de resistência principalmente por transferência horizontal ou por mutação em genes que já possuíam. As mutações podem ocorrer espontaneamente, e muitas vezes é necessária a acumulação de várias para desenvolver completas e funcionais resistências. A aquisição de DNA é um fenómeno que pode ocorrer por três mecanismos: transformação (captura de DNA livre e incorporação no genoma ou plasmídeo), transdução (através de DNA de bacteriófagos) ou conjugação, onde resistências localizadas em elementos genéticos móveis como transposões ou plasmídeos, podem ser transferidos entre diferentes estirpes ou espécies de bactérias recetoras. Também se pensa que, determinantes genéticos de virulência, se localizados nas mesmas plataformas genéticas dos genes de resistência, possam ser co-transportados sob a pressão seletiva dos antibióticos (Villa, García-Fernández, Fortini, & Carattoli, 2010). No entanto outros compostos podem contribuir para a seleção dessas

bactérias resistentes, tal como biocidas ou detergentes, ou a presença no ambiente de metais pesados, pois determinantes de resistência podem estar presentes em replicões que contêm outros marcadores de seleção como proteção contra tais compostos (Alonso et al., 2001). Assim, alguns fatores ambientais como a poluição com esse tipo de compostos, pode também contribuir para a seleção das espécies portadoras de genes que permitam colonizar esses habitats, transportando conseqüentemente genes de resistência que as possam acompanhar. O nível de resistência em bactérias como *E. coli* é considerado um bom indicador da pressão seletiva que está a ser exercida pelo uso de antimicrobianos e, simultaneamente, dos problemas a serem esperados nas bactérias patogénicas (van den Bogaard & Stobberingh, 2000).

Nas últimas décadas tem-se observado um crescimento marcante na prevalência das resistências a antimicrobianos à escala global. O uso intensivo, e principalmente o uso desadequado dos antibióticos levaram ao desenvolvimento e seleção de bactérias resistentes em diferentes ambientes. Além do seu uso como terapia em animais e humanos, os antimicrobianos são também largamente utilizados como agentes profiláticos e como promotores do crescimento na agricultura e aquacultura (Smet et al., 2010). Assim, bactérias resistentes não estão apenas confinadas ao panorama clínico dos humanos, como hospitais, mas também aumentaram drasticamente em animais de produção (espécies pecuárias) e de companhia. Os animais podem atuar assim como reservatórios e podem transmitir essas bactérias aos humanos (ou vice-versa), ou apenas transferir genes (em caso de não conseguirem colonizar o intestino humano), por contacto direto ou através da cadeia de alimentação, que juntamente com comércio internacional e viagens, permite a disseminação de microrganismos rapidamente para países distantes (Hawkey & Jones, 2009).

Algumas bactérias com múltiplas resistências que conferem grande preocupação para os peritos da comunidade anti-infeção foram classificados como patogénicos ESKAPE sendo que grande parte são bactérias gram-negativo: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species* (Bush, 2010). É importante monitorizar a resistência a antimicrobianos em bactérias classificadas como indicadoras, como a *E. coli*, conforme recomendação da WHO (2000), e analisar o fenótipo e mecanismos de resistência destas bactérias, em diferentes áreas

geográficas, tanto em animais utilizados para consumo (Sabarinath et al., 2011) , como em animais de companhia.

1.2.1. Antibióticos β -lactâmicos e β -lactamases

Os antibióticos disponíveis atualmente dividem-se em várias classes: aminoglicosídeos, glicopéptidos, quinolonas, macrolídeos, tetraciclina e β -lactâmicos. Os antibióticos β -lactâmicos disponíveis consistem todos na presença de um anel β -lactâmico reativo, podendo ser divididos em cinco subgrupos que incluem: penamós, penemos, carbapenemos, cefemos, cefamicinas e monobactams (Quadro I). Penamós são um grande grupo de β -lactâmicos que incluem a penicilina. A natureza reativa do anel β -lactâmico torna estes antibióticos suscetíveis a processos degradativos. Além disso, foi verificado que muitas bactérias produzem um grupo de enzimas com capacidade degradativa, inativando o anel β -lactâmico, por clivagem da ligação amida. Estas enzimas são conhecidas coletivamente como penicilases onde o tipo mais prevalente são as β -lactamases, que atacam e quebram as ligações β -lactam tornando o antibiótico inofensivo para as bactérias. Juntamente, outras enzimas podem ser produzidas, que confirmam modificações que também inativem o antibiótico. Hoje em dia, existem compostos (ácido clavulânico - AC, tazobactamo e sulbactamo) que se ligam às β -lactamases irreversivelmente, inativando-as e, assim, permitindo o tratamento com alguns antibióticos β -lactâmicos. As cefalosporinas são os maiores representantes do grupo Cefem. Estas são eficientemente hidrolisadas pelas β -lactamases, e o seu metabolismo de ação é análogo às penicilinas, formando uma ligação covalente com as sintetases do peptidoglicano (PBPs), perturbando a sua formação e levando posteriormente à lise celular. Segundo a classificação microbiológica, as cefalosporinas estão divididas em primeira até quinta geração, diferindo no seu espectro de ação antimicrobiano e na sua estabilidade. As gerações mais recentes são cefalosporinas de espectro alargado de ação. Cefalosporinas de 1ª geração são principalmente ativas contra coccus gram-positivo. Conforme se vai passando para as gerações seguintes, o espectro de ação alarga-se às bactérias gram-negativo diminuindo porém a atividade para as bactérias gram-positivo. Cefalosporinas de 3ª geração são muito utilizadas no controlo de infeções por gram-negativo, adquiridas em hospitais. As de 5ª geração foram desenvolvidas com alvo nas bactérias resistentes. Alguns antibióticos desta classe são efetivos

contra *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) mas ineficazes contra bactérias produtoras de β -lactamases que inativam antibióticos de largo espectro: ESBL (*extended spectrum β -lactamases*). A sobre-utilização de cefalosporinas de 3^a geração é reconhecida como um fator de risco para a seleção de novas estirpes resistentes com importantes consequências epidemiológicas e terapêuticas. Esta classe de antibióticos devia ser considerada para tratamento em animais apenas quando todos os outros antibióticos falham (Gandolfi-Decristophoris, Petrini, Ruggeri-Bernardi, & Schelling, 2013). Vários estudos confirmaram que a restrição no uso das cefalosporinas de terceira geração reduz a frequência de ESBL encontradas nos isolados bacterianos. Outros β -lactâmicos como monobactams são resistentes a β -lactamases e ativos em gram-negativo, não funcionando no entanto em bactérias gram-positivo. Imipenem, o primeiro composto do tipo Carbapenemo, tem boa atividade contra muitos gram-positivo e negativos e é resistente contra algumas β -lactamases, sendo assim utilizados como terapia em infeções complicadas causadas por *Enterobacteriaceae* produtores de β -lactamases que inativam antibióticos de largo espectro, sendo, no entanto, antibióticos mais tóxicos, muito caros e de utilização restrita. Além da produção destas enzimas, a resistência das bactérias aos β -lactâmicos pode ser dependente da produção de PBP's de baixa afinidade para os β -lactâmicos (e.g. PBP2 em MRSA), ou ainda a presença de bombas de efluxo que adicionalmente utilizam estes antibióticos como substratos.

Quadro I – Subtipos de antibióticos β -lactâmicos (adaptado de www.medscape.com).

Penicilinas	Baixo espectro	β -lactamase suscetíveis	Benzilpenicilina, Benzilpenicilina benzatina, Benzilpenicilina procaina, Fenoximetilpenicilina
		β -lactamase resistentes	Cloxacilina (Dicloxacilina, Flucloxacilina), Oxacilina, Meticilina, Nafcilina
	Largo espectro	Aminopenicilinas	Amoxicilina, Ampicilina, Epicilina
		Carboxipenicilinas	Carbenicilina, Ticarcilina, Temocilina
		Ureidopenicilinas	Azlocilina, Piperacilina, Mezlocilina
Outros		Meciliname, Sulbenicilina	
Cefalosporinas	1^a geração	Cefazolina, Cefadroxilo, Cefalexina, Cefaloridina, Cefalotina, Cefapirina, Cefatrizina, Cefazedona, Cefazaflur, Cefradina, Cefroxadina, Ceftezole	
	2^a geração	Cefaclor, Cefamandol, Cefeminox, Cefonicide, Ceforanide, Cefotiam, Cefeprozil, Cefebuperazona, Cefuroxima, Cefuzonam	
	3^a geração	Cefixima, Ceftriaxona, Cefoperazona, Cefotaxima, Cefpodoxima, Cefdinir, Cefsulodina, Cefecapene, Cefdaloxima, Cefditorena, Cefetamet, Cefmenoxima, Cefodizima, Cefpimizola, Cefpiramide, Cefteram, Ceftributeno, Cetriolene, Cefvizoxima	
	4^a geração	Cefepima, Cefpiroma, Cefquinoma, Cefozopran	
	5^a geração	Ceftobiprole, Ceftaroline fosamil	
Cefamicinas	Cefoxitina, Cefotetana, Cefmetazole		
Carbacefemos	Loracarbef		
Monobactamos	Aztreonam, Tigemonam, Carumonam, Tabtoxin		
Carbapenemos	Imipenem, Metropenem, Ertapenem, Doripenem, Biapenem, Panipenem		

A resistência aos β -lactâmicos é um problema crescente e em grande parte derivado da produção de enzimas β -lactamases (EC 3.5.2.6), o mecanismo mais comum de resistência a estes compostos, especialmente em bacilos gram-negativo. Todas as β -lactamases catalisam a mesma reação mas devido a vários tipos de enzimas terem sido isoladas e caracterizadas, elas foram classificadas segundo a estrutura primária (classe A à D) e segundo as características funcionais bioquímicas - substrato e perfil inibitório (grupo I a IV) (Ambler,

1980; Bush, Jacoby, & Medeiros, 1995) (Quadro II e Anexo 1). As β -lactamases A C e D são serino-lactamases e as de classe B são metalo-lactamases. A classe A corresponde às penicilases, a B às metalo- β -lactamases, a C às cefalosporinases e a D às oxacilinas. As classes A e C são as de ocorrência mais frequente entre as bactérias. O grupo 1 da classificação por Bush engloba as cefalosporinases (degradam cefalosporinas de espectro alargado e são resistentes ao AC), o grupo 2 inclui as β -lactamases suscetíveis ao AC, o grupo 3 consiste em metalo- β -lactamases que hidrolisam o imipenem e são inibidas por EDTA e resistentes ao AC, e o grupo 4 inclui as restantes lactamases. A primeira β -lactamase descrita era mediada por um plasmídeo e localizada numa transposição, e foi descoberta em 1960 numa estirpe de *E. coli*, sendo nomeada de TEM-1 de acordo com o nome Temoniera, o paciente que do qual foi isolada. De acordo com a sua localização genética, a sua disseminação foi facilitada sendo atualmente encontrada em muitas outras espécies. Enquanto a maioria das enzimas TEM são ESBL, as variantes TEM-1,2,13 conseguem apenas hidrolisar derivados da penicilina (Livermore, 1995). Com a utilização de antibióticos de largo espectro para combater as resistências verificadas muitas outras variantes de TEM foram isoladas e sequenciadas, e descobertas novas β -lactamases como SHV-1 (de *Sulphydryl variable*) que pode ser localizada no cromossoma em algumas espécies, mas sendo mediada por plasmídeo em *E. coli* (Heritage, 1999). SHV-2 é capaz de hidrolisar cefotaxima. Estas enzimas não possuíam no entanto capacidade de degradar cefalosporinas de largo espectro, monobactâmicos e carapenems. No entanto, a utilização em larga escala destes antibióticos, é considerada como a principal causa de mutações nestas enzimas, levando à emergência de outras variantes com essa capacidade, sendo assim denominadas de cefalosporinases de largo espectro ou ESBL. Assim podemos definir ESBL como β -lactamases codificadas em plasmídeos que conseguem hidrolisar cefalosporinas de 3ª geração e gerações anteriores, assim como penicilinas e monobactâmicos, mas não cefamicinas e carbapenemos, sendo inibidas pelo ácido clavulânico (Colodner, 2005). No entanto, se a produção destas enzimas for muito elevada, é possível resistirem à combinação com o ácido clavulânico. Esta definição continua em constante debate e novas definições são propostas (Giske et al., 2009). Foi verificado que existem comumente outros fatores de resistência presentes nos organismos ESBL, responsáveis pela resistência às tetraciclina, aminoglicosídeos e quinolonas, pois são genes ligados ao genes *bla* (Colodner, 2005). Posteriormente foi descoberto outro grupo de genes de resistência com rápida

disseminação e cuja enzima apresenta grande afinidade à cefotaxima e ceftazidima, sendo denominada de CTX-M-1. Esta enzima foi descoberta pela primeira vez em 1995, numa *E. coli* em Munique. Ao contrário de muitas β -lactamases para as quais a fonte original permanece desconhecida, a origem do gene *bla*_{CTX-M} foi identificada em algumas espécies do Género *Kluyvera*, pertencente à Família *Enterobacteriaceae*. Na maioria dos casos, os genes *bla*_{CTX-M} adquiridos estão associados com duas sequencias de inserção que são capazes de mobilizar segmentos de DNA flanqueadores (Toleman, Bennett, & Walsh, 2006). Estas sequências de inserção (ISEcp1 e ISCR1) aparentemente foram responsáveis pela captura dos genes *bla*_{CTX-M} do cromossoma de *Kluyvera* spp. e respetiva transposição para plasmídeos (D'Andrea, Arena, Pallecchi, & Rossolini, 2013). Ocasionalmente outros contextos genéticos foram reportados. Devido à constante mutação destas enzimas, em resposta à pressão do uso de antibióticos, muitas outras variantes de ESBL foram descobertas. As enzimas CTX-M tornaram-se atualmente as mais prevalentes em *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL na Europa e outras partes do mundo e são atualmente divididas em cinco grupos com base nas suas semelhanças de aminoácidos: CTX-M-1/2/8/9 e CTX-M-25 (Bonnet, 2004). Estas diferem entre elas em menos de 10% de aminoácidos, e cada grupo inclui um número de variantes que diferem por poucas substituições de aminoácidos (menos de 5%) (D'Andrea et al., 2013). Uma variante, CTX-M-15 foi demonstrada como sendo a mais associada com isolados humanos recolhidos em hospitais e tornou-se a ESBL mais disseminada mundialmente (Nicolas-Chanoine et al., 2008), sendo inclusive já detetada em animais de estimação (Ewers et al., 2010; Hordijk et al., 2013; Huber, Zweifel, Wittenbrink, & Stephan, 2013). Um fator essencial envolvido na expansão de *E. coli* produtoras de ESBL é a disseminação clonal, como exemplificado pela disseminação global de um clone virulento (B2-O25:H4-ST131) que se pensa ser o responsável pela disseminação pandémica da enzima CTX-M-15 em hospitais e outras comunidades na Europa. A sua grande disseminação é devido ao transporte do gene *bla*_{CTX-M-15} ser feito em plasmídeos com grande mobilidade (Da Silva & Mendonça, 2012). Até ao momento, 95 variantes foram introduzidas na base de dados “Lahey clinic” (Anexo 2). Estas enzimas parecem ainda ser mais facilmente inibidas pelo tazobactam do que pelo ácido clavulânico. Com a introdução do uso de cefalosporinas de largo espectro, e a emergência das β -lactamases de largo espectro, as escolhas terapêuticas reduziram drasticamente. As estirpes ESBL tem a capacidade de inativar todos os antibióticos

β -lactâmicos a um nível variável, com a exceção dos carbapenemos. Atualmente outras séries de ESBL menos prevalentes foram também descritas e já possuem capacidade de hidrolisar carbanemos, como as VEB, GES e KPC, OXA (alguns tipos atuando também em cefalosporinas) e metalo- β -lactamases IMP e VIM, sendo assim muito preocupantes em virtude de serem co-produzidas com outras β -lactamases, conseguirem hidrolisar praticamente todas os β -lactâmicos (com exceção do aztreonam), e não serem inibidas por nenhum inibidor terapêutico. Em 2009, constatou-se o surgimento de uma nova enzima MBL, a NDM-1 (New Delhi MBL) que ganhou atenção mundial (Yong et al., 2009). Estas enzimas não são frequentemente encontradas em animais (Ewers, Grobbel, Bethe & Sebastian, 2011). Outro tipo de β -lactamases observadas em gram-negativo são as enzimas da classe C, que se podem encontrar codificadas em plasmídeos ou cromossoma - ampC β -lactamases. Os padrões de resistência associados a ampC β -lactamases são muito similares a outras ESBL, conferindo resistência a quase todos os β -lactâmicos, no entanto, as enzimas ampC são fracamente inibidas pelos inibidores de β -lactamases e usualmente conferem resistência a cefamicinas e carbapenemos. As AmpC adquiridas incluem enzimas tipo ACC, CMY/LAT, MOX e DHA. O primeiro gene *ampC* descoberto em plasmídeo foi o *CMY-1* em 1989, seguido do *CMY-2*. Desde então vários outros tipos como os referidos anteriormente foram descritos. Até ao momento, *CMY* e *DHA* são os genes *ampC* mais frequentes em *E. coli* e *K. pneumoniae*. Estes genes presentes em plasmídeos estão muitas vezes proximamente relacionadas com as AmpC β -lactamases determinadas no cromossoma (Jacoby, 2009). A prevalência de β -lactamases do tipo ampC continua a ser mais baixa que a classe A de ESBL (Migliavacca et al., 2007). A possibilidade de uma bactéria gram-negativo ser hospedeira de vários genes de resistência transportados por plasmídeos como ESBL, *ampC* e carbapenemases já é uma realidade. A sua transferência para plasmídeos, transposões, e cassetes de genes em integrões resultou na disseminação entre espécies, tornando-se um grave problema de saúde pública. Os plasmídeos são elementos genéticos que estão livres no citoplasma, apresentando uma replicação individual. Integrando vários genes “não essenciais”, podem também transportar genes de resistências, passando a ser denominados plasmídeos R. Estes podem conter transposões que são segmentos de DNA que podem ser transferidos entre plasmídeos ou destes para o cromossoma. Os transposões podem transportar vários genes de resistência e, mesmo não sendo conjugativos, podem passar para outras bactérias quando existem plasmídeos

conjugativos. Integrões são elementos genéticos que possuem um local no qual DNA adicional pode se integrado sobre a forma de cassetes de genes (normalmente um gene e uma sequência que funciona como local de recombinação), por recombinação mediada por uma integrase também aí codificada. Foi recentemente criada uma compilação das β -lactamases catalogadas de acordo com a estrutura e função, estando representado no trabalho de Karen Bush & Jacoby, 2010, podendo também ser observado no quadro II. Estas β -lactamases podem ser produzidas por uma variedade de *Enterobacteriaceae* no entanto os organismos mais comuns produtores de ESBL são a *Klebsiella pneumoniae*, outras *Klebsiellas* spp. e *E. coli*. As β -lactamases podem ser encontradas extracelularmente em bactérias gram-positivo ou no espaço periplasmático em bactérias gram-negativo (Bush, 1988).

Estudos recentes demonstraram que *E. coli* produtoras de ESBL estão presentes em animais de produção (bovinos, suínos, coelhos), animais de companhia (cães, gatos) e em animais selvagens (gaiotas e passeriformes) (Simões, Poirel, Da Costa, & Nordmann, 2010) e fontes ambientais, além de humanos (Hordijk et al., 2013). Até à data a maior proporção de *E. coli* produtoras de ESBL em animais foi verificada num estudo observacional em cães saudáveis (7,8%) e gatos (12,1%), em Portugal (Costa et al., 2008; Ewers, Grobbel, Bethe & Sebastian, 2011). O risco dos microrganismos transportarem *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL aumenta com as terapias com antimicrobianos utilizadas pelo menos nos três meses anteriores (Gandolfi-Decristophoris et al., 2013).

A identificação de organismos ESBL em clínica é um desafio devido à variável afinidade destas enzimas para diferentes substratos. Algumas ESBL podem parecer suscetíveis a cefalosporinas de terceira geração *in vitro*, no entanto, o tratamento de uma infeção provocado por um organismo ESBL com esse antibiótico levaria provavelmente a uma falha terapêutica. Nos últimos anos, o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), tem atuado de modo a padronizar métodos de reconhecimento de ESBL, recomendando a pesquisa em isolados de *Klebsiella* spp. e *E. coli* sendo que uma contração mínima inibitória - MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) superior ou igual a 8 μ g/mL contra cefpo-doxime e maior ou igual a 2 μ g/mL para, ceftazidime, aztreonam, cefotaxime ou ceftriaxone, indica potenciais produtores de ESBL. O MIC deve ser observado após 16-18h de incubação a 35 \pm 2°C. Outros indicadores de ESBL são a redução da resistência na presença do ácido clavulânico, ou a potenciação da zona de inibição do crescimento. Os métodos recomendados

para deteção de ESBL são: o método da difusão de discos, a combinação de discos de cefalosporina/ácido clavulânico, agar suplementado com clavunato, método da substituição de discos e teste tri-dimensional (Paterson & Bonomo, 2005). Recentemente foram desenvolvidos sistemas automatizados (Vitek ou Microscan). Outro produto efetivo na deteção de ESBL é o *Etest*, pelo que estudos da sua efetividade juntamente com a dos sistemas automatizados, foram realizados, demonstrando aproximadamente 90% de sensibilidade na deteção.

Tendo em conta que muitos isolados clínicos transportam mais que uma β -lactamase, estudos de caracterização molecular através de multiplex PCR são cada vez mais utilizados para a sua deteção, caracterização de genótipo ESBL e para estudos epidemiológicos (Dallenne, Da Costa, Decré, Favier, & Arlet, 2010). Muitos autores otimizaram protocolos para a pesquisa destes genes, tendo Dallenne e colaboradores desenhado primers e otimizado vários multiplex e simplex PCR de modo a abranger os genes mais frequentemente responsáveis pelas resistências aos β -lactâmicos (como apresentado no Capítulo II – Materiais e métodos).

Estudos em diferentes regiões, de modo a caracterizar a prevalência de genes de resistência aos β -lactâmicos e outros antibióticos são essenciais, não só entre humanos mas também em animais de produção e animais de companhia. A deteção precoce de ESBL, o uso prudente dos antibióticos apropriados e a implementação de estratégias de controlo de infeções é importante para controlar a disseminação desta ameaça pela comunidade (Gráfico I).

Quadro II - Classificação das β -lactamases segundo Ambler (1980), exemplos enzimáticos mais associados e fenótipos de resistência (adaptado de Pfeifer, Cullik, & Witte, 2010).

	Classe da β -lactamase	β -lactamases	Exemplos importantes	Ocorrência preferencial	Fenótipos de resistência importantes
Serino- β -lactamases	A	β -lactamase de amplo espectro	TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11	<i>Enterobacteriaceae</i> e não fermentadores	Ampicilina, cefalotina
		ESBL tipo TEM	TEM-3, TEM-52		Penicilinas, cefalosporinas de 3 ^a geração
		ESBL tipo SHV	SHV-5, SHV-12		
		ESBL tipo CTX-M	CTX-M-1, CTX-M-15		
		Carbapenemases	KPC, GES, SME		
	C	AmpC cefamicinas (codificados em cromossoma)	AmpC	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp.	Cefamicinas (cefotaxima) Cefalosporinas de 3 ^a geração
	D	AmpC cefamicinas (codificados por plasmídeo)	CMY, DHA, MOX, FOX, ACC	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> ; <i>A. baumannii</i>	Cefamicinas (cefotaxima), cefalosporinas de 3 ^a geração
		β -lactamase de amplo espectro	OXA-1, OXA-9		Oxacilina, ampicilina, cefalotina
ESBL tipo OXA		OXA-2, OXA-10	Penicilinas, cefalosporinas de 3 ^a geração		
Carbapenemases		OXA-48, OXA-23,-24, -58	Ampicilina, imipenem, todos os β -lactâmicos		
Metallo- β -lactamases	B	Metallo- β -lactamases (carbapenemases)	VIM IMP	<i>Enterobacteriaceae</i> e não fermentadores	Todos os β -lactâmicos

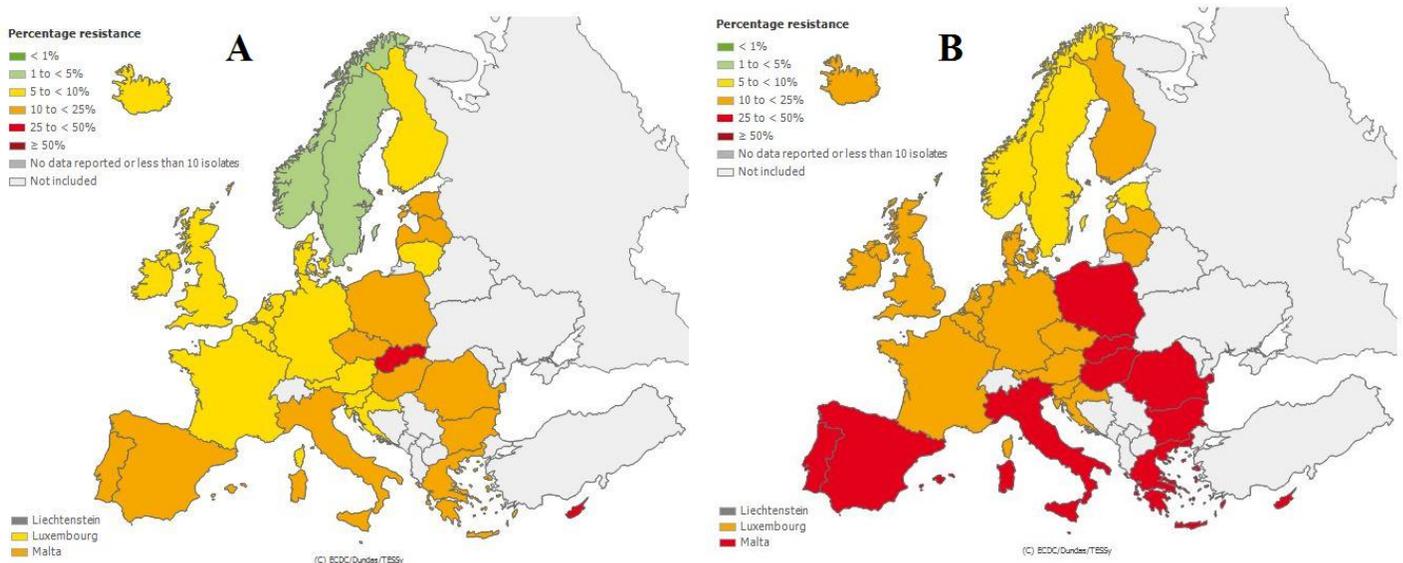
1.2.2. Quinolonas

As quinolonas estão entre os antimicrobianos mais comumente prescritos devido à sua atividade de largo espectro. Resistência às quinolonas é principalmente mediada pela mutação de genes cromossomais que codificam para DNA girase ou topoisomerase IV. As subunidades de DNA girase são codificadas pelo genes *gyrA* e *gyrB*, enquanto que as subunidades

correspondentes à topoisomerase IV são codificadas pelos genes *parC* e *parE*. Estas duas enzimas trabalham em conjunto durante a replicação, transcrição, recombinação e reparação do DNA. As quinolonas bloqueiam a ação destas enzimas formando um complexo inativo antibiótico-enzima-DNA. Algumas bactérias são capazes de sobreviver com apenas DNA girase mas a maioria das bactérias apresenta ambas as enzimas (Jacoby, 2005). Em bactérias gram-negativo a enzima girase é mais suscetível à inibição pelas quinolonas que a topoisomerase IV, enquanto nas gram-positivo a topoisomerase IV é o alvo principal. Assim, mutações que conferem resistências ocorrem primeiro em *gyrA* em bactérias gram-negativo, mas ocorrem primeiro em *parC* em gram-positivo. Mutações no alvo mais suscetível define o nível de suscetibilidade e mutações noutros genes contribuem para o aumento da resistência. As mutações envolvem substituições de aminácidos numa região da subunidade GyrA e ParC chamada de “região determinante da resistência às quinolonas” (QRDR). Inicialmente pensava-se que a resistência às quinolonas só poderia ser adquirida por mutações cromossomais até que foram descritos genes de resistência presentes em plasmídeos. Os grupos principais de determinantes de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos (PMQR) foram identificados: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*, sendo responsáveis pela inibição da ligação das quinolonas ao DNA pois são proteínas que se ligam à girase ou topoisomerase IV protegendo-as do antibiótico, permitindo a continuação da replicação do DNA; *aac(6')-Ib-cr*, que codifica uma variante de aminoglicosídeo que modifica a ciprofloxacina, reduzindo a sua atividade, e *qepA*, que codifica a formação de uma bomba de efluxo para as quinolonas hidrofílicas como ciprofloxacina e norfloxacina. No entanto, quando sozinhos, os genes PMQR não conferem, resistência total às quinolonas, havendo porém, vários estudos que suportam que o aumento da prevalência de genes PMQR (i.e. *qnr* e *aac(6')-Ib-cr*) têm contribuído para o aumento da resistência às quinolonas em *Enterobacteriaceae*, pois embora confirmam baixo nível de resistência, potenciam o número de mutantes resistentes que podem ser selecionados numa população (Cesaro et al., 2008). Cesaro et al., 2008 e Lascols et al., 2007 demonstraram que resistência à ciprofloxacina está diretamente relacionada com o número de mutações em *gyrA* e *parC*, e posteriormente com a presença adicional de genes *qnr*, em estirpes de *Enterobacter cloacae* e *E. coli*. Os genes de resistência *gyrB* e *parE* são menos pesquisados pois conferem baixos níveis de resistência e mutações nesses genes são menos frequentes relativamente ao genes *gyrA* e *parC* (Hooper,

1999). Estas resistências estão frequentemente associadas a *Enterobacteriaceae* com fenótipos de resistência específicos, como ESBL e/ou reduzida suscetibilidade ao ácido nalidíxico. As quinolonas são comumente utilizadas para tratar ITU em cães e gatos, sendo a enrofloxacina (um análogo da ciprofloxacina) o mais prescrito (Liu, Boothe, Thungrat, & Aly, 2012). Resistência a esta classe de antimicrobianos está frequentemente associado com multiresistências, tendo este facto também já sido verificado em cães e gatos (Shaheen, Boothe, Oyarzabal, & Smaha, 2010). A ligação genética entre baixa resistência às quinolonas e outras multiresistências (β -lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfonamidas) promove a co-selecção das resistências às quinolonas aquando da exposição a outros antimicrobianos (Lavigne et al., 2006), pois o gene que codifica a resistência a esta classe de antimicrobianos integra uma “bateria” de genes, que codificam resistências a outros tipos de antimicrobianos, ou seja, uma vez induzida a resistência às quinolonas, a bactéria vai apresentar não só resistência a essa mas também a outras classes de agentes antimicrobianos (Wilcox, 2009).

Gráfico I – Proporção de resistência a cefalosporinas de 3ª geração (A) e fluoroquinolonas (B) em *E. coli* em alguns países, em 2011. Em cinza estão países que não foram incluídos ou reportaram menos de 10 isolados. (retirado de <http://ecdc.europa.eu/>)



1.3. *Enterococcus* spp.

Enterococcus spp. são bactérias gram-positivo, em forma de cocos, apresentando-se em pares ou pequenas cadeias, anaeróbios facultativos, normalmente catalase negativos, crescem a temperaturas compreendidas entre 10° e 45°C, em meios com 6,5% NaCl, a pH 9.6, na presença de bÍlis e mantêm viabilidade após aquecimento a 60°C durante 30min, sendo algumas espécies móveis (*E. casseliflavus* e *gallinarum*) devido a pequenos flagelos. Apresentam ainda um metabolismo fermentativo, seguindo a via *Embden-Meyerhof-Parnas*, resultando na produção de ácido láctico. Tolerância à bÍlis e hidrolise da esculina frequentemente indicam a presença de *Enterococcus*. Estes encontram-se frequentemente no trato gastrointestinal de mamíferos e aves e são facilmente isolados no solo, águas de superfície, sedimentos, vegetação associada com águas superficiais, ambientes marÍtimos (devido à sua capacidade de tolerar elevadas concentrações salinas), e alimentos como o queijo (Anderson, Whitlock, & Harwood, 2005; Harwood et al., 2004). *Enterococcus faecium* e *faecalis* fazem parte da flora fecal e intestinal de humanos e animais, no entanto são organismos notÓrios na medicina humana e veterinÁria pela sua inerente e adquirida resistência a múltiplos antibióticos, e presença de fatores de virulência capazes de causar doença particularmente em indivíduos com patologias intercorrentes (Teng, Jacques-Palaz, Weinstock, & Murray, 2002). Estudos recentes documentam que *Enterococcus* spp. são considerados importantes agentes causadores de infeções nosocomiais, estando associados a casos de endocardite, bacteriemia, infeções urinÁrias e septicémia neonatal (Fisher & Phillips, 2009) sendo que 85 a 95% das infeções provocadas por *Enterococcus* spp. são causadas pela espécie *E. faecalis*, e 5-10% por *E. faecium* (Moellering, 1992). *Enterococcus* são o segundo grupo mais estudado de bactérias (depois da *E. coli*) devido à sua importância como agente patogénico. *Enterococcus* são também pesquisados para avaliar a qualidade da água, enquanto indicadores de contaminação fecal. Assim, a correta identificação da espécie é necessária para a monitorização clínica e ambiental. No entanto, os enterococos são ativos contra alguns patogénicos presentes nos alimentos, podendo ser sugerida a sua utilização como bioconservadores em alimentos (Franz, van Belkum, Holzappel, Abriouel, & Gálvez, 2007). Também têm sido investigados como potenciais probióticos, embora seja uma questão

controversa devido ao aumento das infeções provocadas por estes microrganismos (Martín-Platero, Valdivia, Maqueda, & Martínez-Bueno, 2009).

A avaliação das características morfológicas e comparação dos perfis de utilização de carboidratos, tal como a presença de certas enzimas e a formação de certos metabolitos em meios definidos, são características que permitem diferenciar e identificar *Enterococcus spp.* Estes métodos baseados no fenótipo, em testes bioquímicos, ou *kits* comerciais, utilizados para identificar e caracterizar as espécies não são muito discriminatórios ou precisos, devido às similaridades existentes entre certas espécies. Adicionalmente, são trabalhosos (é preciso preparar material para vários testes), e podem ser dispendiosos. As análises com base no DNA, como genotipagem, sequenciação genética, e estudo da presença de genes característicos da espécie com primers específicos, são também utilizados para a especiação de *Enterococcus*, tendo como grande vantagem focarem-se na composição única de ácidos nucleicos dos microrganismos, em vez da expressão fenotípica dos produtos codificados pelos respetivos genes. A sequenciação do gene 16S rRNA é considerado “*the gold standard*” para a identificação microbiana (Clarridge, 2004), no entanto métodos de genotipagem como BOX-PCR são mais acessíveis e não requerem análise por sequenciação. Além disso, os métodos de genotipagem conseguem ser mais discriminatórios dentro das mesmas espécies ou espécies próximas, permitindo estudos de diversidade a nível das estirpes. A sequenciação de 16SrRNA permite uma boa discriminação entre espécies e estudos de relações filogenéticas, mas é inadequado para subespécies e identificação de estirpes (Nayak, Badgley, & Harwood, 2011). Vários estudos epidemiológicos envolvendo a caracterização ao nível da estirpe e diferenciação intra-espécies foram relatados. Muitos desses estudos lidam com a prevalência de *E. faecium* resistentes à vancomicina (VRE) em pacientes hospitalizados (Morrison, Woodford, Barrett, Sisson, & Cookson, 1999; Vancanneyt et al., 2002), ou com a transmissão de *Enterococcus spp.* de animais para humanos (Bates, Jordens, & Griffiths, 1994). Outros avaliam ainda as relações genómicas entre *E. faecium* isolados de humanos, de alimentos e de animais (Jurkovic et al., 2007). As várias técnicas utilizadas para tipagem molecular variam entre os trabalhos, desde a utilização de AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*), REA (*Restriction endonuclease analysis*), estabelecimento de perfil plasmídico, ribotipagem, RAPD-PCR (*Random amplified polymorphic DNA*), PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*), MLST (*Multilocus sequence typing*) e ERIC-PCR (*Enterobacterial repetitive intergenic*

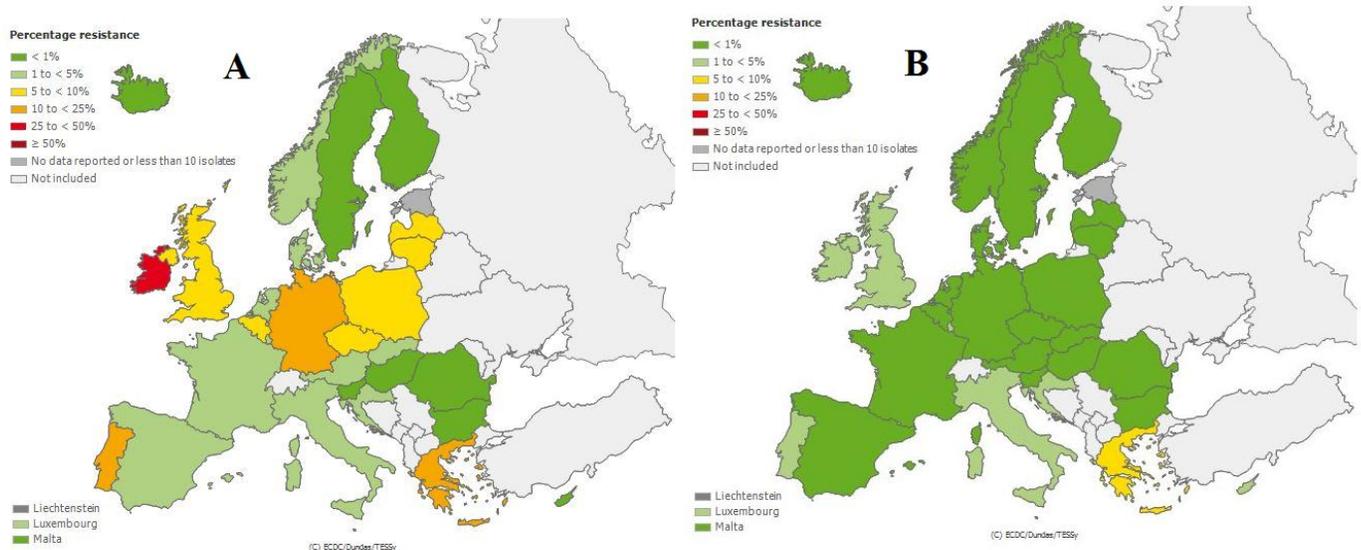
consensus). PFGE é considerado como sendo superior, na interpretação da proximidade clonal de entre várias espécies bacterianas incluindo *Enterococcus* spp. (Descheemaeker, Lammens, Pot, Vandamme, & Goossens, 1997). No entanto, Jurkovic et al., 2007, concluíram que para objetivos epidemiológicos a utilização de ERIC PCR, comparado com outros métodos, apresenta benefícios pela sua rapidez e baixo custo. Alguns primers para o gene específico do Género foram desenhados tendo em conta o gene 16S rRNA e permitiram a distinção de estirpes. A amplificação por PCR seguida de sequenciação e comparação com os genes alvo permitiu diferenciação entre as espécies. Foi verificado recentemente que alguns genes como fator de alongação (EF-tu) e superóxido dismutase dependentes de manganês parecem apresentar regiões variáveis específicas de cada espécie que podem ser uteis para o desenvolvimento de métodos para identificação de espécies. Assim, em 2004, Jackson, Fedorka-Cray, & Barrett desenvolveram uma metodologia de multiplex PCR que permitiu identificar o género e a espécie simultaneamente. O gene da superoxide dismutase (*sodA*) foi identificado como um alvo potencial para a diferenciação de espécies (Poyart, Quesnes, & Trieu-Cuot, 2000), devido ao facto das variações no gene parecerem ser maiores entre as espécies e menor intra-especies. Assim, foram desenhados primers específicos da espécie com base em sequências únicas do gene *sodA* para cada espécie, sendo que através de sete grupos de reações de multiplex PCR, com dois protocolos de amplificação, se obtém a identificação de 23 espécies de *Enterococcus* e se simplifica grandemente o procedimento de especiação (como descrito no Capítulo II – Materiais e Métodos). Estes primers foram desenhados por amplificação de uma porção do gene *sodA* utilizando primers degenerados, seguido de sequenciação desses produtos e comparação das sequências genéticas conservadas dentro de cada espécie e degeneradas entre espécies. Quando juntamente com primers para identificação de género (como os desenhados por Deasy, Rea, Fitzgerald, Cogan, & Beresford, 2000), o multiplex PCR fornece um método preciso para identificação de *Enterococcus*, sem a necessidade de realização de testes fenotípicos extensivos. Vários testes foram realizados e comparação com vários *kits* permitiu definir este método como eficaz. Alguns problemas foram verificados quando culturas muito puras não eram utilizadas, resultando numa mistura de bandas e de resultados, algumas bandas inespecíficas, que no entanto se encontram fora dos pesos dos produtos que são esperados sendo facilmente identificadas como artefactos.

Espécies não caracterizadas ou isolados menos frequentes que possam conter variações nas sequências *sodA*, podem também resultar na não produção de amplicões.

Os glicopéptidos (Vancomicina e Teicoplanina) são antibióticos de último recurso utilizados no tratamento de infeções causadas por enterococos multirresistentes. Estes antibióticos interferem com a biossíntese do peptidoglicano por se ligarem ao resíduo terminal D-alanil-D-alanina do peptidoglicano, inibindo assim a síntese da parede celular. Resistência a esses importantes antibióticos foi encontrada em várias partes do mundo (Schouten, Hoogkamp-Korstanje, Meis, & Voss, 2000) (Gráfico – II). Além de ser alarmante a transmissão da resistência à vancomicina entre *Enterococcus* spp., esta resistência pode também ser adquirida por outras espécies do Género *Staphylococcus* (Cetinkaya, Falk, & Mayhall, 2000). VRE podem ser classificados pelo fenótipo ou genótipo. Os fenótipos de resistência aos glicopéptidos em *Enterococcus* spp. podem ser distinguidos de acordo com o nível de indução de resistência à vancomicina e teicoplanina. Alguns genes de resistência foram descritos, onde alguns são mecanismos adquiridos e outros são propriedades intrínsecas. Genes de resistência *vanA* e *vanB* foram verificados primariamente em *E. faecium* e *E. faecalis* (Woodford, 1998), e são os genótipos de resistência mais comuns. A aquisição do gene *vanA* confere resistência a elevadas concentrações de vancomicina e teicoplanina, enquanto que organismos portadores de *vanB* são resistentes à vancomicina numa vasta gama de concentrações e geralmente suscetíveis a teicoplanina. O fenótipo *vanC*, de resistência intrínseca a baixas concentrações de vancomicina, foi descrita em *E. gallinarium* e *E. casseliflavus* (Woodford, 1998). O fenótipo de *vanD* é caracterizado pela resistência a moderados níveis de vancomicina e baixos níveis de teicoplanina e foi descrita num isolado de *E. faecium* (Perichon, Reynolds, & Courvalin, 1997). *VanE* é um tipo induzível de resistência a baixos níveis de vancomicina e exibe suscetibilidade à teicoplanina, e foi apenas detetado numa estirpe de *E. faecalis*. Recentemente foi detetado um gene *vanG* em quatro estirpes de *E. faecalis* isolados em hospital, que apresentam nível de resistência moderado à vancomicina e susceptibilidade à teicoplanina (McKessar, Berry, Bell, Turnidge, & Paton, 2000). *Enterococcus* são tipicamente tolerantes aos β -lactâmicos, devido à produção de PBP de baixa afinidade, cuja quantidade produzida é proporcional à resistência à penicilina, e também devido à produção de β -lactamases em baixa quantidade e independente da presença de inóculo (Cetinkaya et al., 2000). Resistência a aminoglicosídeos, como a estreptomicina

ocorre devido à baixa permeabilidade celular (que confere um nível de resistência moderado) , ou devido a produção de enzimas inativadoras (confere elevado nível de resistência), mecanismo que confere também resistência a gentamicina e outros aminoglicosídeos, sendo a resistência à gentamicina um bom indicador da resistência a outros aminoglicosídeos, excetuando a estreptomicina, cuja enzima de inativação é diferente. *E. faecium* é mais resistente às penicilinas e *E. gallinarium* é mais resistente aos glicopéptidos que *E. faecalis*. Adequada identificação das espécies de enterococos é, mais uma vez, importante pois existem diferenças específicas em cada espécie relativamente à suscetibilidade aos antibiótico β -lactâmicos e glicopéptidos. Vários estudos para caracterização destas resistências por PCR foram realizados, havendo já vários protocolos (Kariyama, Mitsuata, Chow, Clewell, & Kumon, 2000; Patel, Uhl, Kohner, Hopkins, & Cockerill, 1997; Pérez-Hernández, Méndez-Alvarez, & Claverie-Martín, 2002). Um dos métodos desenvolvidos de multiplex PCR é rápido e simultaneamente identifica os isolados de *Enterococcus* ao nível do género (tendo como alvo o gene *tuf* que codifica um fator de alongação que está envolvido na formação da cadeia peptídica, que é um constituinte essencial da parede celular) e ao mesmo tempo deteta os tipos de genes mais frequentes de resistência à vancomicina (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*) transportados por esses isolados. Várias resistências foram verificadas em isolados o que faz com que seja necessário a realização de testes de suscetibilidade antes da realização de terapias com antimicrobianos.

Gráfico II – Proporção de resistência à vancomicina em *Enterococcus faecium* (A) e *faecalis* (B) em alguns países, em 2011. Em cinza estão países que não foram incluídos ou reportaram menos de 10 isolados. (retirado de <http://ecdc.europa.eu/>)



1.4 . Transferência bacteriana entre espécies

A resistência antimicrobiana é um problema muito complexo que envolve várias espécies bacterianas, vários mecanismos, transferência de genes e reservatórios (Guardabassi, Schwarz, & Lloyd, 2004). Vários estudos demonstram que a utilização de antimicrobianos como potenciadores de crescimento de animais para consumo, contribui largamente para a seleção de estirpes resistentes ao qual somos expostos através da cadeia de alimentação (Wegener, Aarestrup, Gerner-Smidt, & Bager, 1999) , ou transferência indireta através de águas ou materiais contaminados. Os antimicrobianos utilizados em animais para consumo são frequentemente administrados de um modo que contribui para o aumento das resistências, pois são administradas doses sub-terapêuticas, os tratamentos são repetidos em massa e prolongadamente como promotores de crescimento ou são ainda utilizados como profiláticos na alimentação e água. No entanto alguns autores consideram que este problema é sobrevalorizado, sendo esquecidos os meios de transmissão não derivados da alimentação

(Barber, Miller, & McNamara, 2003) existindo uma grande percentagem de aquisição bacteriana resistentes através do contacto entre humanos, exposição ambiental, e transmissão direta via contacto com os animais de estimação. O número de cães e gatos na sociedade atual é cada vez maior e o nosso comportamento para com eles tem vindo a mudar. Se no passado, os cães eram mantidos fora de casa, agora partilhamos locais de repouso com eles. Contacto físico como festas e lambidelas ocorre frequentemente devido à corrente perceção destes animais como membros da família (Guardabassi et al., 2004; Voith, 1985). Pela mesma razão, depositamos muito cuidado na saúde e bem estar destes animais, o que leva a grandes cuidados veterinários, tratamentos e uso de medicação como antimicrobianos como prevenção, ou para tratamento de doenças infecciosas. Especialmente em cães, estes tratamentos incluem preparações antimicrobianas e outros compostos de grande importância para tratamento de infeções humanas. Em parte, devido à venda de medicações e tratamentos para animais de estimação ser um nicho de mercado e por haver alguma facilidade na prescrição de antimicrobianos em casos de diagnóstico duvidosos, sem testes prévios para identificação bacteriana e testes de suscetibilidade para melhor seleção de antibiótico e, também, devido à pressão exercida pelos clientes em ser administrado algum tipo de tratamento, origina o uso inapropriado de antibióticos. Assim, verifica-se um aumento na prescrição de certos antibióticos de largo espectro na prática veterinária de pequenos animais, como quinolonas e cefalosporinas, maior que na indústria de animais de produção alimentar, devido à possibilidade de ineficácia do tratamento com antibióticos de primeira linha, que obriga a nova consulta e faz os clientes se questionarem da eficácia dos tratamentos e do atendimento. Embora em Portugal a única cefalosporina de largo espectro autorizada para o uso em cães e gatos seja a cefovecina, outras mais estão autorizadas para o uso em animais de produção e medicina humana, podendo ser adquiridas livremente, pelo que podem ser utilizadas na prática clínica da medicina veterinária. Como consequência, resistência a estes compostos emerge tanto em bactérias patogénicas como comensais. A transmissão de agentes comensais ou patogénicos da flora microbiana, entre animal de companhia e proprietário, pode ocorrer diretamente através do contacto com fezes (via fecal-oral), urina, saliva, unhas, pele e pelo, ou ainda por arranhões, mordidelas, por vetores (pulgas, carraças) ou indiretamente através de superfícies e utensílios domésticos que os animais tenham acesso (mantas, brinquedos, coleiras) (Schwarz 2001; Johnson 2001), originando dois hospedeiros. Ao contrário de muitas

doenças, a resistência a antimicrobianos pode ser transmitida de um hospedeiro para outro, mesmo na presença de um número baixo de bactérias. A ocorrência dos mesmos genes de resistência em bactérias de diferentes fontes sugere que a transferência está associada com elementos genéticos móveis, sendo muito difícil determinar onde o gene apareceu em primeiro e em que direção a transferência foi efetuada, no entanto, tipagem molecular das estirpes em questão irá fornecer informação importante que confirma ou exclui a proximidade dessas estirpes, isoladas do humano e do animal. A tipagem genética de microrganismos é possível através de variadas técnicas que têm como base variações a nível do genoma entre diferentes estirpes, permitindo o estudo da filogenia de organismos. O objetivo final destas técnicas é a obtenção de um padrão de bandas (fragmentos de DNA) comparável e específico para cada estirpe, resultante da amplificação de certas sequências repetitivas e conservadas do DNA ou através da fragmentação deste, resultante da utilização de enzimas de restrição. Vários surtos de infeções foram estudados, através de PFGE, um método muito discriminatório para tipagem bacteriana, que comprovou a transmissão humana – animais. É o caso de surtos de salmonelose (Stehr-Green & Schantz, 1987) e campilobacteriosis (Neimann, Engberg, Mølbak, & Wegener, 2003; Salfeld & Pugh, 1987). Vários estudos existem e comprovam a passagem de bactérias patogénicas entre humanos e animais de estimação, mas pouco é sabido da troca de flora bacteriana comensal entre animais e humanos que vivem em conjunto. O conhecimento corrente é limitado principalmente à transmissão de *S. intermedius*, uma bactéria comensal mas também patogénica em cães e gatos, e que esta muito presente nos trabalhadores de clínicas que estão em constante contacto com estes animais (Harvey, Marples, & Noble, 1994). O facto de esta bactéria ser rara em humanos sugere transmissão animal-humano.

As classes de antibióticos frequentemente utilizados na medicina veterinária de pequenos animais são as penicilinas, cefalosporinas, macrolídeos, lincosamidas, ácido fusídico, tetraciclina, clorofenicol, sulfonamidas, aminoglicosídeos, e quinolonas. Em muitos países, não há registos do consumo de antimicrobianos administrados em animais de estimação. Assim torna-se impossível de determinar a pressão seletiva imposta pelo seu uso e o seu efeito no desenvolvimento das resistências. Assim, é deixado à responsabilidade de cada veterinário, seguir as instruções de várias organizações, de modo a minimizar o desenvolvimento de resistências e manter assim a eficácia dos correntes agentes

antimicrobianos. Apesar da autorização para o uso das quinolonas na veterinária de pequenos animais seja recente na Europa (meados de 1990), resistência a esta classe de antibióticos começa a emergir em bactérias colonizadoras dos animais. Animais de estimação podem ser reservatórios de espécies bacterianas e genes de resistência de importância clínica para os humanos, como MRSA, VRE e *Salmonella typhimurium* multirresistente. No entanto deve ser referido que estes animais parecem ser contaminados pela exposição a humanos infetados não sendo assim provavelmente o reservatório primário, mas atuando como reservatório secundário (por exemplo no caso de MRSA) (Guardabassi et al., 2004). De modo a preservar e eficácia da vancomicina na medicina humana, o uso de avoparcina como promotor do crescimento animal em animais de produção foi banido na união europeia em 1997. No entanto, alguns estudos demonstram a presença de VRE, especialmente em *Enterococcus faecium*, em cães que vivem em contacto com animais de quinta, mas também em áreas urbanas. VRE presentes em cães apresentam o gene *vanA* e exibem múltiplas resistências a outros antimicrobianos como macrolídeos, tetraciclina, e aminoglicosídeos. Assim, embora a vancomicina não seja utilizada na clínica veterinária, VRE devem ser co-seleccionados pelo uso de outros antibióticos. Alguns estudos descreveram a ocorrência de *E. coli* produtoras de ESBL/ampC em animais de consumo, que se verifica serem também isoladas em animais de companhia (Hordijk et al., 2013). Alguns dos genes mais frequentemente associados com resistências bacterianas nos animais de companhia (e que correspondem a várias enzimas) são: genes *bla*_{CTX-M (1,14,15)}, seguido de *bla*_{TEM-52} e *bla*_{SHV-12}, e *bla*_{CMY-2} entre as ampC β -lactamases (Quadro III) (Carattoli et al., 2005; Gandolfi-Decristophoris et al., 2013). Uma distribuição semelhante é observada em humanos onde *bla*_{CTX-M-14} e *bla*_{CTX-M-15} são os mais verificados independentemente da região (Ewers, Bethe, Semmler, Guenther, & Wieler, 2012). A informação publicada até ao momento representa uma pequena diversidade de β -lactamases de largo espectro de origem animal comparada com o que está documentado em humanos. Visto que as enzimas reportadas refletem normalmente as mais encontradas em amostras humanas de acordo com a região geográfica, é possível assumir que devido ao pequeno número de estudos em clínica veterinária, apenas as enzimas mais frequentes são detetadas.

Em algumas patologias, como o caso de ITU, apesar da flora fecal da própria pessoa ser normalmente a fonte da *E. coli* patogénica extraintestinal (ExPEC) responsável pela patologia (Yamamoto et al., 1997), os reservatórios externos de onde o hospedeiro

inicialmente adquiriu tais estirpes são pouco estudados e compreendidos, assim como os mecanismos de transmissão (Johnson, Owens, Gajewski, & Clabots, 2008). Algumas evidências suportam a ideia da ocorrência da transmissão de ExPEC via sexual (Johnson, Brown, Carlino, & Russo, 1998). Isso justificaria as recorrentes infeções verificadas sempre pela mesma estirpe, pois o agente patogénico persiste no reservatório externo (o parceiro sexual). No entanto, dois estudos longitudinais envolvendo um agregado sugeriram que a transmissão de clones de uma mesma *E. coli* dentro de um mesmo espaço, pode também envolver pais, crianças, familiares e animais de estimação. Dentro de um agregado familiar conseguiram verificar que o clone responsável pela ITU da mãe era partilhada por vários membros, incluindo o cão (Johnson & Clabots, 2006). Os cães são considerados como um potencial reservatório de *E. coli* capaz de causar infeções do trato urinário em mulheres, em vários estudos (Johnson et al., 2000; James R Johnson, Stell, & Delavari, 2001), revelando perfis similares em PFGE, e presença de fatores de virulência quer nas *E. coli* fecais dos canídeos, quer nas *E. coli* isoladas de mulheres com cistites. No entanto, outros estudos compararam a suscetibilidade antimicrobiana de isolados fecais de cães e isolados fecais e da urina em humanos e encontraram uma baixa percentagem de resistências em isolados dos cães concluindo que os cães também possam estar em risco de adquirirem *E. coli* resistentes dos humanos (Sannes, Kuskowski, & Johnson, 2004). Noutro trabalho também foi observado que isolados de *E. coli* obtidos de fezes de animais que nunca tinham tido contacto com humanos não apresentavam resistências e que havia um aumento destas à medida que aumentava a exposição a humanos (Skurnik et al., 2006). Num trabalho de James R Johnson & Clabots, 2006, encontraram alguma dificuldade na distinção de estirpes com diferenças muito subtis, aquando da utilização de uma só enzima de restrição em PFGE, no entanto, quando utilizadas duas, foram detetadas variações no perfil genotípico que inicialmente parecia igual, mas apenas quando eram estirpes isoladas de diferentes agregados, o que não se verificou quando eram estirpes isoladas de diferentes membros dentro de um mesmo agregado, o que fornece evidências da disseminação de estirpes clonais. Neste estudo, a partilha foi mais comum entre animais de estimação, seguida de humanos, e em último partilha entre animais-humanos. No entanto, confirmou-se que humanos e seus animais de estimação transportam os mesmos clones de *E. coli* podendo ser a partilha em qualquer direção. E, porque mais de 50% das *E. coli* fecais de cães e gatos exibem características virulentas, apresentando potencial patogénico

para os humanos (Johnson, Stell, & Delavari, 2001) , é possível que uma estirpe co-partilhada entre humanos e animais surja como uma ameaça à saúde dos humanos, mais que a partilha de clones entre humanos. Apesar destes estudos sugerirem que transmissão bacteriana entre espécies possa ocorrer, também foram isoladas *E. coli* semelhantes de cães e humanos sem contacto direto ou ambiental, o que não exclui a possibilidade que humanos e animais adquiram as mesmas estirpes de fontes externas comuns, sem trocarem diretamente as estirpes (Johnson, Delavari, Stell, et al., 2001). No entanto, devido a estudos que comprovam a transmissão de outros microrganismo patogénicos de cães e gatos para humanos (Elliot, Tolle, Goldberg, & Miller, 1985) parece muito provável que os humanos encontrem *E. coli* de fontes canídeas ou felinas, com alguma frequência, quer nos próprios animais, ou no ambiente partilhado. A hipótese de humanos serem colonizados e infetados por *E. coli* derivadas de animais domésticos, sugere que as práticas de utilização de antibióticos em veterinária possam ter implicações significantes na seleção de resistências antimicrobianas entre, o que potencialmente poderão ser, microrganismos patogénico para humanos. Similarmente, as práticas de utilização de antibióticos em medicina humana podem também influenciar a seleção de resistências em potenciais agentes patogénicos animais. Mais estudos da transmissão de microrganismos entre animais domésticos e humanos, das consequências para a saúde de tais transmissões, e da prevalência de ESBL em animais de companhia são necessários, pois a informação até agora é limitada. Em Portugal existem muitos estudos com variados animais, mas poucos sendo com animais de companhia, sendo que um deles foi realizado por Costa et al., 2008 que verificou que em cães e gatos saudáveis a resistência a cefalosporinas de 3^a geração e outros β -lactâmicos era baixa comparando com outros antibióticos. No entanto, noutros países como a Holanda, utilizando meios seletivos, conseguiram isolar *Enterobacteriaceae* do trato intestinal, produtoras de ESBL/ampC em percentagens de presença de 45% em cães saudáveis, 55% em cães com diarreia, e 25% em gatos (Hordijk et al., 2013). Em Portugal, em nenhum estudo é abordada a comparação entre as estirpes isoladas dos animais e as estirpes isoladas dos proprietários e seu habitat doméstico.

Quadro III - Presença de β -lactamases em cães e gatos doentes e saudáveis em diferentes trabalhos (retirado de Smet et al., 2010). Outro quadro mais detalhado apode ser encontrada no trabalho de Ewers, Grobbel, Bethe & Sebastian, 2011.

Animal	Porcentagem das amostras em que foram encontradas β -lactamases (número total de amostras testadas)	Proporção (%) de amostras positivas em que cada β -lactamase foi descoberta	Espécie	Ano de isolamento	País	Referência
Cães	10.4 (75)	TEM-52 (75), CTX-M-1 (25)	<i>E. coli</i>	Não especificado	Portugal	Costa et al., 2004
	20 (72)	CTX-M-1 (7.5)	<i>E. coli</i>	2001-2003	Itália	Carattoli et al., 2005
	14.3 (70)	CTX-M-1 (40), CTX-M-14 (40), PER-2 (50)	<i>E. coli</i>	2006	Chile	Moreno et al., 2007
	7 (72)	CMY-2 (5)	<i>E. coli</i>	2001-2003	Itália	Carattoli et al., 2005
Gatos	5.7 (70)	CTX-M-1 (100), PER-2 (75)	<i>E. coli</i>	2006	Chile	Moreno et al., 2007
Animais doentes						
Cães	19.4 (72)	CTX-M-1 (52), SHV-12 (20)	<i>E. coli</i>	2001-2003	Itália	Carattoli et al., 2005
	4.2 (72)	SHV	<i>E. coli</i>	Não especificado	Portugal	Feria et al., 2002
	11 (72)	AmpC	<i>E. coli</i>	Não especificado	Portugal	Feria et al., 2002
	1.6 (61)	CTX-M-15 (33)	<i>E. coli</i>	2004-2006	Portugal	Pomba et al., 2008
	3.2 (61)	CMY-2 (66)	<i>E. coli</i>	2004-2006	Portugal	Pomba et al., 2008
	1.4 (72)	CMY-2 (5)	<i>E. coli</i>	2001-2003	Itália	Carattoli et al., 2005
	4.7 (780)	CMY-7	<i>E. coli</i>	2000-2001	Austrália	Sidjabat et al., 2006
Gatos	2.7 (72)	CTX-M-1 (10.5)	<i>E. coli</i>	2001-2003	Itália	Carattoli et al., 2005

1.3. Técnicas de genotipagem bacteriana

1.3.1. ERIC-PCR

Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC), são sequências pequenas e repetitivas de DNA e muito conservadas. São regiões de 126pb não codificantes, presentes em múltiplas copias nos genoma da maioria dos gram-negativo e em alguns gram-positivo (Hulton, Higgins, & Sharp, 1991; Versalovic et al., 1991; Woods, Versalovic, Koeuth, & Lupski, 1993). O ERIC PCR utiliza uma combinação de primers desenhados com alta homologia para essas sequências repetitivas inter-genicas, de modo a gerar um padrão electroforético de bandas entre 50 a 3000pb (Di Giovanni, Watrud, Seidler, & Widmer, 1999) resultantes da amplificação de DNA entre as sequências ERIC, por PCR, baseado na frequência e orientação das sequencias no genoma bacteriano. As localizações únicas dos elementos ERIC nos genomas bacterianos permitem a discriminação de género, espécie e estirpe, com base no padrão electroforético dos produtos de amplificação. A genotipagem por ERIC PCR é rápida e mais barata que o PFGE ou MLST de modo a se obter informação sobre a similaridade genética das estirpes bacterianas. Para muitos organismos possui um elevado poder discriminatório, maior que outras técnicas rápidas (Saxena, Singh, Lakhcharua, Taj, & Sharma, 2002). Alguns estudos demonstram a boa discriminação entre isolados na utilização do ERIC-PCR (de Bruijn, 1992; Valenzuela, Benomar, Abriouel, Cañamero, & Gálvez, 2010), outros revelam que a tipagem se revela mais fraca em genomas de bactérias gram-positivo (Di Giovanni et al., 1999). Existem também algumas dúvidas sobre a sua reprodutibilidade entre experiências (Johnson, Clabots, Azar, et al., 2001; Loubinoux et al., 1999; Pettigrew, Foxman, Ecevit, Marrs, & Gilsdorf, 2002). No entanto, pela sua rapidez, baixo custo e boa discriminação em diversas amostras de DNA, é uma técnica ideal para tipagem molecular rotineira de laboratório.

A genotipagem é feita utilizando as sondas ERIC R1 e ERIC2 de 22pb, individualmente ou em conjunto, permitindo obter diferentes padrões de bandas (Johnson & O'Bryan, 2000) (Figura 2). Bandas bem marcadas são geralmente consistentes mas bandas leves são frequentemente sujeitas variações inter-experimentais, que são ignoradas na análise

humana (de la Puente-Redondo, del Blanco, Gutiérrez-Martín, García-Peña, & Rodríguez Ferri, 2000; Wong & Lin, 2001) . No entanto, ao utilizar o software de análise e calculo de similaridades, somos deparados com uma inconsistência na identificação da presença e ausência de bandas, o que complicaria ainda mais, se além de uma análise baseada na presença ou ausência de bandas, fosse feita uma análise considerando a intensidade das bandas. Bandas ténues podem escurecer ou clarear ou até desaparecer entre diferentes experiências (Meacham et al., 2003). Assim, alguns autores eliminam bandas ténues da análise com a intenção de eliminar a falta de reprodutibilidade da tipagem (Soto, Guerra, del Cerro, González-Hevia, & Mendoz, 2001). No entanto, o ato de escolha das bandas que vão ser analisadas diminui significativamente o poder discriminatório da técnica. Apesar das variabilidades intra-experimentais serem importantes na análise de qualquer técnica de tipagem, a maior dificuldade aparece na comparação de diferentes experiências de PCR e diferentes corridas em géis (J R Johnson & O'Bryan, 2000). Weijtens, Reinders, Urlings, & Van der Plas, 1999 sugerem que uma técnica de tipagem adicional em conjunto com ERIC PCR seja necessária, se objetivo do trabalho for comprovar uma ligação epidemiológica. Outras técnicas utilizadas para a genotipagem e diferenciação de estirpes podem ser *Repetitive sequence-based polymerase chain reaction* (como BOX-PCR, REP-PCR), sequenciação do gene 16S rRNA, MLST e PFGE. Um bom método reprodutível em larga escala para relacionar isolados com o seu hospedeiro e de acordo com a sua patogenicidade, é também o AFLP (*amplified fragmente length polymorphism*), que no entanto é mais demorado e mais dispendioso que o ERIC-PCR (Leung, Mackereth, Tien, & Topp, 2004) .

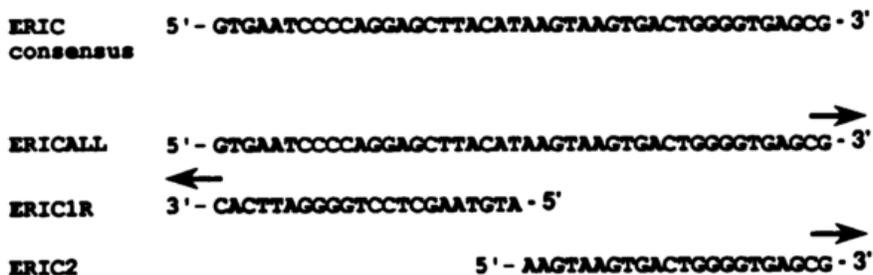


Figura 2 – Alinhamento das sequências dos primers ERIC em relação à sequência *consensus* do ERIC publicada. (retirado de Versalovic et al., 1991).

1.3.2. Electroforese em campo pulsado (PFGE)

A identificação de linhagens bacterianas que antigamente era apenas baseada em características fenotípicas (biotipagem, testes morfológicos e bioquímicos, testes de suscetibilidade antimicrobiana, serotipagem, tipagem por bacteriófagos) é agora utilizada juntamente com abordagens genotípicas, onde entre elas o PFGE é das mais aceites, sendo muito frequentemente utilizado, para estudos epidemiológicos de *Staphylococcus aureus*, (onde, por exemplo, permitiu verificar que MRSA isolados em vários locais do mundo possuíam uma origem comum); epidemiologia de VRE, e epidemiologia de *E. coli* patogénicas como a 0157:H7. PFGE é uma técnica de electroforese que permite separar grandes moléculas de DNA por meio da sua reorientação em gel derivado da ação de campos elétricos alternados, tendo em conta que todos os fragmentos de DNA maiores que 20 kb vão exibir a mesma mobilidade num gel de electroforese convencional, usando um campo elétrico estático. A combinação de PFGE com enzimas de restrição permite a diferenciação de estirpes assim como estimar o tamanho cromossomal. Esta técnica possui um elevado poder discriminatório, sendo os padrões de restrição obtidos por PFGE reproduzíveis. Estão ainda disponíveis padrões de critérios para uma melhor interpretação. Assim, este método é classificado como o *gold standard* para a tipagem molecular de bactérias, permitindo a classificação e diferenciação de estirpes. No entanto é uma técnica cuja resolução depende de vários fatores como voltagem, concentração de agarose, temperatura, *buffer*, tempo de pulso e de corrida electroforética. A matriz de agarose atua como um filtro, cuja porosidade é inversamente proporcional á concentração do gel de agarose. A dificuldade em migrar para o polo positivo é inversamente proporcional ao tamanho de cada molécula, onde as menores migram com maior velocidade, o que permite a separação por tamanho ou peso molecular. Um gel de agarose a 0,8% é apropriado para a separação de fragmentos de 0,5 a 20-30kb, se o gel for mais concentrado irá permitir melhor separação de fragmentos mais pequenos (80 a 500pb) (Goering, 2010). Desde 1984 surgiram vários protocolos de forma a otimizar a separação de grandes moléculas de DNA. Os diferentes métodos baseiam-se em alternância de campos elétricos transversais (como o CHEF), ou alternância de campos elétricos invertidos (FIGE). Estas técnicas permitem a separação de fragmentos de DNA de aproximadamente 600kb ou ainda de cromossomas inteiros. A duração do tempo de pulso é um dos fatores mais

importantes. Pulsos mais longos possibilitam a reorientação de moléculas grandes, pulsos curtos reorientam apenas as pequenas moléculas de DNA. As condições para a corrida electroforética em campo pulsado de bactérias como *E. coli* já se encontram otimizadas em vários trabalhos, sendo que o ângulo mais frequentemente utilizado para o aparelho CHEF-DRIII da Bio-Rad é 120° com 6 V/cm, refrigeração a 14°C, utilização de *buffer* 0,5X Tris-Borate-EDTA (45mM Tris, 45mM borato, 1mM EDTA pH8,3) e gel de agarose *pulsed field* a 1% (Goering, 2010). Esta agarose permite a formação de géis com poros mais largos, o que permite uma melhor resolução de moléculas grandes. O gel é ainda mais forte de modo a que baixas percentagens de agarose possam ser utilizadas, assim, por exemplo, um gel *pulsed field* de 1% originará resultados semelhantes a um gel de 0,8% com agarose normal, mas será muito mais forte (Goering, 2010). Rotineiramente é utilizada a solução tamponante TBE com uma concentração de 0,5x. No entanto, o Tris foi relatado como agente de degradação do DNA e alguns autores obtiveram melhores resultados com o uso de outra solução, HEPES (Koort, Lukinmaa, Rantala, Unkila, & Siitonen, 2002). Melhor resolução é obtida com o aumento da concentração de agarose, no entanto implica maior tempo de corrida. Alterações na temperatura também interferem na resolução, pelo que quanto maior a temperatura mais rápida será a migração das moléculas, mas perde na resolução. A integridade do DNA aquando da corrida electroforética também é relevante, assim a extração do DNA é feita pela incorporação das células bacterianas em blocos de agarose, que proporcionam proteção mecânica às moléculas de DNA. A agarose deve ser *low melting* e na mesma proporção que a solução com as células bacterianas para os blocos de agarose não fiquem demasiado rígidos, (dificultando a posterior digestão do DNA, e lavagens para remoção de contaminantes) nem demasiado moles, o que pode elevar à sua destruição durante as pipetagens e lavagens. Outra vantagem da incorporação em agarose é a estabilidade das amostras durante muito tempo quando conservadas a 4°C. Este protocolo é dispendioso pois requer grandes quantidades de enzimas líticas e de restrição, e demorado, em virtude de ser necessário mais tempo de digestão e várias lavagens, para que as enzimas atravessem as barreiras da agarose, e para serem eliminados contaminantes e inibidores. Um fator importante desta técnica é também a proteção do material contra a ação das DNases que são libertadas durante a lise celular. Assim, nas soluções de lavagem é requerida a presença de um agente quelante como o EDTA 0,5M que sequestra iões que vão servir como cofatores dessas enzimas. (Magalhães et al.,

2005) . Como o objetivo final da maioria das utilizações desta técnica é a análise da proximidade genética entre isolados, é necessário a obtenção de um padrão de bandas. Este é conseguido pela digestão com enzimas de restrição , que clivam o DNA genómico em vários fragmentos de levado peso molecular, variando as unidades necessárias conforme a enzima em questão, sendo essa informação e outras como o tempo de digestão necessário, sugeridas pelos fornecedores. No geral, existe uma relação inversa entre o comprimento da sequência de reconhecimento e a frequência da sua ocorrência. O conteúdo em GC também influencia a frequência das zonas de restrição, fazendo com que certas enzimas cortem mais ou menos vezes conforme a constituição genómica da bactéria em questão, permitindo assim a seleção da melhor enzima conforme a frequência de corte desejada. Alguns fatores como a metilação do local de restrição podem também impedir a ação de uma enzima. Outros estudos utilizando duas ou mais enzimas de restrição podem também ser aplicados para estabelecer com maior clareza o grau de relacionamento entre as amostras. Vários estudos referem o facto da uniformidade entre laboratórios desta técnica se tornar um desafio (te Witt, van Belkum, MacKay, Wallace, & van Leeuwen, 2010) . Assim, na tentativa de padronizar esta técnica de tipagem, a *United States Centers for Disease Control PulseNet* e a *Pulsenet International Consortium of laboratories*, desenvolveram e empregam protocolos para diferentes bactérias de modo a demonstrar que a uniformidade no PFGE e reprodutibilidade entre laboratórios pode ser conseguida. Nestes protocolos é dado ênfase ao controlo de qualidade nas maiores áreas da potencial variabilidade do PFGE como a preparação do DNA, a escolha da enzima de restrição e nas condições de electroforese. Os procedimentos para preparação do DNA para PFGE variam para bactérias gram-positivo e gram-negativo, devido à dificuldade de extração do DNA em gram-positivo, onde será necessário por exemplo a utilização de enzimas que ajudem á lise celular, como a lisostafina (Goering, 2010) . Alguns autores introduziram modificações aos protocolos para aumentar a velocidade deste procedimento tanto para *E. coli* como *Enterococcus* (Gautom, 1997; Matushek, Bonten, & Hayden, 1996; Turabelidze, Kotetishvili, Kreger, Morris, & Sulakvelidze, 2000), ou até para reduzir os custos deste protocolo nas bactérias gram-positivo (Feizabadi, Ghodousi, Nomanpour, Omrani, & Shahcheraghi, 2011). Considera-se que para um bom poder discriminatório da técnica, deve-se avaliar a combinação enzima de restrição/espécie bacteriana (Quadro IV), e a obtenção de um mínimo de dez fragmentos de DNA, ou seja, de dez bandas no gel. Os fragmentos gerados são

de seguida separados pela electroforese em campo pulsado. Para a interpretação dos resultados do PFGE, em 1995, Tenover et al., publicaram critérios de interpretação de resultados desta técnica de tipagem, de modo a homogeneizar a interpretação dos resultados e permitindo comparação entre diferentes grupos de trabalho. Segundo Tenover et al, bactérias envolvidas num surto epidemiológico devem apresentar padrões indistinguíveis, enquanto as não envolvidas devem apresentar padrões distintos. Uma linhagem é considerada semelhante a outra (relacionada ou possivelmente relacionada), quando a variação entre eles é derivada de um evento genético como uma mutação, uma inserção ou deleção, que leve à alteração do padrão de bandas, pois pode originar a supressão ou criação de um sitio de reconhecimento da enzima. Se acontecer a inserção de um novo elemento genético isto pode por sua vez originar um sitio não reconhecido pela enzima, aumentando o tamanho de uma das bandas, caso origine novo sítio de corte, duas novas bandas surgirão. Assim, estes eventos originam a alteração de duas ou três bandas. Quando o padrão variar em maior número de bandas estas devem ser consideradas não relacionadas geneticamente (Figura 3). Para a definição de isolados como sendo clones bacterianos, costuma ser utilizada a percentagem de 94% de similaridade obtida pela análise computacional (em *software* adequado) dos resultados obtidos em PFGE. Este *cutoff* parece ser o mais consistente com a literatura corrente neste campo (Johnson & Clabots, 2006; Johnson et al., 2008; Stenske et al., 2009). No entanto, definições de partilha de um mesmo clone podem variar entre 80 e 100% de similaridade na comparação do padrão de bandas resultantes de tipagem genética (Johnson & Clabots, 2006; Johnson et al., 2008).

PFGE é assim um método eficiente e altamente reprodutível (Domig, Mayer, & Kneifel, 2003) e tem sido aplicado com sucesso a uma extensa série de diferentes organismos gram-positivo e gram-negativo e micobactérias, em estudos epidemiológicos de populações onde as doenças são endémicas, assim como em surtos epidémicos. Contudo, PFGE é uma técnica molecular de tipagem de 3^a geração, que juntamente com uma variedade de outras técnicas (de segunda geração como enzimas de restrição e sondas, ou terceira como PCR), se vai mover em direção à análise com base na sequenciação de DNA, técnicas de 4^a geração (van Belkum et al., 2007).

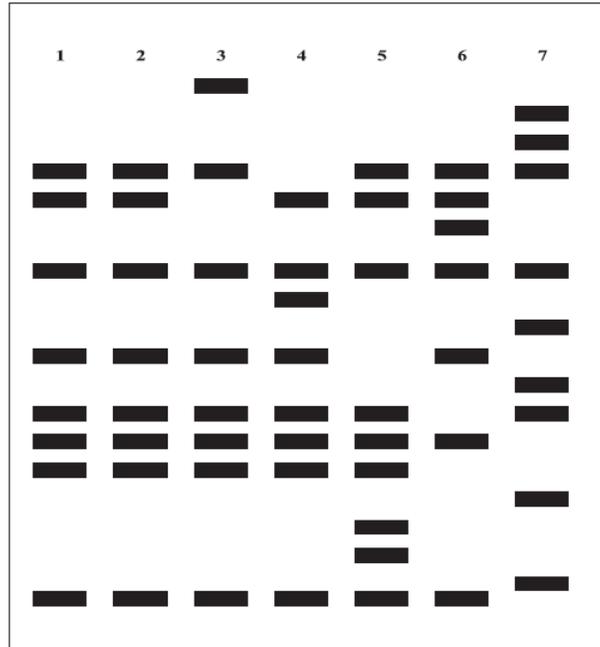


Figura 3 - Esquema exemplificativo de padrões de PFGE para interpretação de eventos genéticos que alterem o número de bandas obtidas resultantes da restrição enzimática. Poços 1 e 2 representam DNA cromossômico com padrões indistinguíveis, sendo consideradas linhagens epidêmicas. Poço 3- uma das bandas recebeu uma inserção e aumentou de tamanho, Poço 4 - uma das bandas sofreu uma deleção e diminuiu de tamanho, Poço 5- uma mutação criou um sítio de restrição, aumentando o número de bandas, Poço 6 – uma mutação alterou um sítio de restrição e dois fragmentos foram perdidos, surgindo um de maior tamanho, Poço 7 – DNA cromossômico com padrão diferentes, não estando relacionado com o surto epidêmico (retirado de Adolfo, 2005).

Quadro IV – Exemplos de enzimas de restrição utilizadas para análise genotípica de DNA bacteriano por PFGE.

Organismo	Enzima de restrição
<i>Acinetobacter</i> spp.	SmaI, ApaI
<i>Bacteroides</i> spp.	NotI
<i>Bordetella pertussis</i>	XbaI, AsnI, DraI
<i>Borrelia budoferi</i>	SmaI
<i>Bukholderia cepacia</i>	SpeI
<i>Camphylobacter</i> spp.	SmaI, SalI, KpnI
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Sse8387I
<i>Citrobacter</i> spp.	XbaI
<i>Clostridium perfringens</i>	SmaI, SacI
<i>Coxiella burnetti</i>	NotI
<i>Enterobacter</i> spp.	XbaI, SpeI
<i>Enterococcus</i> spp.	SmaI, ApaI
<i>Escherichia coli</i>	XbaI, BlnI (AvrII), NotI, SfiI
<i>Haemophilus influenza</i>	SmaI, RsrII
<i>Klebsiella</i> spp.	XbaI, AsnI
<i>Legionella pneumonphila</i>	SfiI, NotI
<i>Listeria monocytogenes</i>	AscI, ApaI
<i>Mycobacterium</i> spp.	AseI, XbaI, DraI, SspI
<i>Neisseria</i> spp.	SpeI, NotI, BglIII
<i>Proteus mirabilis</i>	SfiI, NotI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SpeI, XbaI, DraI, SspI
<i>Salmonella</i> spp.	XbaI, BlnI (AvrII), NotI
<i>Serratia marcescens</i>	XbaI
<i>Shigella</i> spp.	XbaI, BlnI (AvrII), SfiI
<i>Staphylococcus</i> spp.	SmaI, CspI, SstII, SgrAI
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	XbaI
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	SmaI, ApaI
<i>Streptococcus</i> spp. (grupo A e B)	SmaI
<i>Vibrio cholerae</i>	SfiI, NotI
<i>Yersinia pestis</i>	XbaI, AscI

Capítulo II – Materiais e métodos

2.1. Seleção e recolha de amostras

De acordo com os objetivos, o trabalho divide-se em duas componentes. A primeira dirige-se à vigilância epidemiológica, com o intento de determinar a prevalência de resistências a antimicrobianos em *E.coli* isoladas em fezes de animais de companhia. Para tal, entre Setembro de 2009 e Maio de 2012, foram recolhidas amostras de fezes em cem cães e gatos selecionados aleatoriamente no universo de animais que se deslocou para consulta à UPVET (Porto, Portugal). Do conjunto de estirpes obtidas em cães, foram selecionados quarenta isolados de *Escherichia coli* produtoras de ESBL, para i) caracterização molecular das resistências aos β -lactâmicos ii) quinolonas e iii) determinação do filogruppo. Embora o perfil de resistência a antimicrobianos destes isolados seja alargado a outras classes, foram selecionadas apenas duas, tendo em consideração a relevância clínica, e por serem resistências que se encontram frequentemente associadas devido à transferência conjunta que se verifica nesses genes.

Para a segunda componente do trabalho, foram selecionadas estirpes de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. multirresistentes e/ou com perfis de resistência similares, a partir de um conjunto de isolados recolhidos em amostras de fezes, urina, mucosa oral de animais de companhia (cães e gatos) observados no referido hospital, juntamente com isolados fecais dos respetivos proprietários, e isolados obtidos no ambiente doméstico do agregado. A proximidade genotípica destes isolados foi testada, por electroforese em campo pulsado e ERIC PCR, juntamente com a identificação da espécie de *Enterococcus* e caracterização do filogruppo (*E.coli*).

Previamente à recolha das amostras, os objetivos do estudo eram explicados aos proprietários de todos os animais elegíveis e uma autorização formal era assinada. Para o primeiro trabalho foram selecionados aleatoriamente, por semana, dois clientes, que por motivo de doença ou de rotina, se tinham deslocado à consulta, até perfazer um conjunto de cem animais. Para o segundo trabalho selecionaram-se animais que, do *pool* inicial, i) se salientaram pelos perfis de resistência antimicrobiana dos seus isolados, e ii) cujos

proprietários aceitaram colaborar na fase seguinte do estudo. Coincidiram com animais portadores de doenças crónicas ou prolongadas, previamente sujeitos a tratamentos antimicrobianos. Todos os participantes preencheram um questionário para recolha de um conjunto vasto de informações pessoais, médicas (e.g. exposição a antimicrobianos tanto do animal como dos elementos do agregado) hábitos dos animais (e.g. coprofagia) e, tipo de alimentação. Foi também efetuada a recolha de amostras fecais, da secreção da mucosa oral ou do excedente urinário em caso de cistocentese, do respetivo animal. Após a análise dos questionários, foi solicitado a alguns agregados, uma amostra fecal de cada coabitante humano e/ou das suas próprias mãos, colheitas noutros animais coabitantes assim como de amostras adicionais em superfícies do seu habitat (e.g. interruptores, puxadores de portas e eletrodomésticos, trela, cama e taças de alimentação dos animais).

2.2. Processamento das amostras após recolha

As zaragoas rectais eram imediatamente imersas num meio de pré-enriquecimento: *Buffered Peptone Water* - APT (Oxoid). A partir dessa suspensão, foram realizadas sementeiras por esgotamento em *Tryptone Bile X-glucuronide* Agar (TBX; BioKar Diagnostics), meio seletivo para crescimento de *E. coli* e em *Slanetz and Bartley* Agar (SB; Oxoid), um meio para deteção de *Enterococcus*, onde a azida de sódio inibe o crescimento de bactérias gram-negativo. Simultaneamente, esses mesmos meios de cultura foram enriquecidos com diferentes antibióticos: 2 μ g/ μ L de cefotaxima (CTX), 8 μ g/mL de ampicillina (AMP) e 4 μ g/mL de ciprofloxacina (CIP) para os meios TBX e 6 μ g/ μ L de vancomicina (VAN), 8 μ g/mL de AMP e 4 μ g/mL de CIP nos meios SB, onde 100 μ L da suspensão anterior foi semeada por espalhamento. As zaragoas de outras amostras (orais, ambiente doméstico) seguiram o procedimento descrito anteriormente, as urinas eram semeadas diretamente (100 μ L) nos meios referidos. As placas foram incubadas a 37°C por 24h (TBX) e 48h (SB), tendo em conta que os enterococos demoram mais tempo a crescer em SB. Cinco colónias com características fenotípicas de *E. coli* e *Enterococcus* spp. foram aleatoriamente selecionados de cada placa, e confirmada a espécie e Género, mediante a realização de testes bioquímicos. Os isolados foram testados com o objetivo de conhecer o seu

perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e, posteriormente, foram conservados em glicerol a -20°C para posteriores estudos. A utilização de meios enriquecidos com antibióticos permitiu a recolha de bactérias resistentes, que se podiam apresentar ocultas pela sua presença em menor quantidade relativamente à totalidade da microbiota intestinal. Testes microbiológicos e bioquímicos padronizados foram realizados para esclarecimento em caso de dúvida da espécie em questão (Berge, Moore, & Sisco, 2006). Este procedimento foi adaptado de protocolos típicos e procura uma seleção exata de amostras de *E. coli* e enterococos, permitindo também a seleção de diferentes estirpes e com padrões de elevadas e variadas resistências.

2.3. Isolamento de colónias de *Enterococcus* spp.

Todos os isolados selecionados para os estudos fenotípicos e moleculares encontravam-se, no momento de realização deste trabalho, conservados a -20°C em glicerol sendo assim necessário estimular a sua atividade em APT. Para certificar que estávamos mesmo na presença de *Enterococcus* spp. e confirmar a pureza da amostra, foi realizada uma sementeira por esgotamento em meio SB e incubadas as placas numa estufa a 37°C durante 48h. Após verificação de crescimento bacteriano, e presença de colónias avermelhadas que se podem presumir como sendo *Enterococcus* spp., foi realizada uma outra sementeira em *Kanamycin Aesculin Azid Agar* (KAA; Oxoid), outro meio seletivo para o isolamento de *Enterococcus*, incubando-se novamente a 37°C desta vez apenas por aproximadamente por 4h, período suficiente para originarem escurecimento do meio pela atividade esculina-positiva. Após crescimento e verificação de colónias isoladas, com o auxílio de uma lupa, foi repicada uma colónia e realizado um esgotamento em meio *Mueller Hinton Agar* (MH; Biokar Diagnostics), incubado a 37°C por 24h, para obtenção de maior quantidade de amostra bacteriana para procedimentos a seguir enumerados. Quando as colónias se encontravam bem isoladas, repicava-se para tubos de ensaio com APT para posteriormente se confirmar o seu perfil de sensibilidade antimicrobiana.

2.4. Isolamento de colónias de *Escherichia coli*

Utilizou-se metodologia semelhante à referida anteriormente, com alteração dos meios seletivos. Assim procedeu-se à estimulação da atividade dos isolados de *E. coli* em APT. De seguida, para se confirmar a presença de *E. coli*, e confirmar a pureza da amostra, foi realizada uma sementeira por esgotamento em TBX Agar, um meio seletivo, que foi de seguida incubado a 37°C. Após crescimento e verificação de colónias isoladas com as mesmas características fenotípicas, observáveis com o auxílio de uma lupa, como a presença de cor azul esverdeado em caso de *E. coli* glucuronidase positiva (devido ao agente cromogénico X-glucuronide presente neste meio, cujo cromóforo se deposita derivado da ação enzimática da glucuronidase, dando coloração à colónia), foi repicada uma e realizado um esgotamento em meio MH, incubando a 37°C por 24h, para obtenção de maior quantidade de amostra bacteriana para procedimentos a seguir enumerados. Em caso de dúvida na determinação da espécie, ou em caso de não se encontrarem bem isoladas, as amostras foram colocadas em *Brilliant Green Bile 2% Broth* (CBVB; Oxoid) durante 24h na estufa a 44,5°C, onde a turbidez do meio e a produção de gás em tubo Durham invertido são sinais positivos para *E.coli*, isolando-se de seguida por esgotamento em TBX agar. A confirmação da espécie pode também ser efetuada através de alguns testes bioquímicos e microbiológicos com colónias isoladas, tais como teste do indol, fermentação de açúcares (glicose e lactose) e não produção de sulfeto de hidrogénio em meio TSI – *Triple Sugar Iron Agar* (Oxoid). Quando as colónias se encontravam bem isoladas, repicavam-se para tubos de ensaio com APT para, posteriormente estudar o seu perfil de sensibilidade antimicrobiana.

2.5. Teste de suscetibilidade antimicrobiana

As estirpes multirresistentes selecionadas para este trabalho foram, anteriormente a este trabalho, caracterizadas relativamente às suscetibilidades antimicrobianas após os procedimentos mencionados acima. Para a realização dos testes de suscetibilidade a diferentes antibióticos repicou-se uma colónia isolada para tubos de ensaio com 5mL de APT, tendo sido incubados a 37°C até atingirem uma turvação equivalente a 0,5 McFarland. De seguida procedeu-se a uma sementeira por espalhamento, em placas de MH, cobrindo toda a placa

(para observação de halos fíeis e não haver confusão com espaços sem crescimento) com o auxílio de uma zaragatoa humedecida no meio com o cultivo bacteriano, seguido da aplicação dos discos impregnados de antibióticos com um dispensador da Oxoid, para se proceder ao estudo dos padrões de suscetibilidades a antimicrobianos de cada isolado, através do método de difusão por discos, de acordo com as diretivas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2007. Os antibióticos testados nos isolados de *Enterococcus* spp. foram 12: ampicilina (AMP,10 μ g), quinupristina-dalfopristina (QD,15 μ g), tetraciclina (TE,30 μ g), rifampicina (RD,5 μ g), eritromicina (E,15 μ g), gentamicina (CN,120 μ g), vancomicina (V,30 μ g), azitromicina (AZM,15 μ g), teicoplanina (TEC,30 μ g), cloranfenicol (C,30 μ g), nitrofurantoína (F,300 μ g), ciprofloxacina (CIP,5 μ g). No caso de *E. coli* foram usados 19 antibióticos: ampicilina (AMP,10 μ g), cefoxitina (FOX,30 μ g), imipenemo (IPM,10 μ g), ciprofloxacina (CIP,5 μ g), gentamicina (CN,10 μ g), nitrofurantoína (F,300 μ g), tetraciclina (TE,30 μ g), cefotaxima (CTX,30 μ g), aztreonam (ATM,30 μ g), ceftazidima (CAZ,30 μ g), amoxicilina/Ácido Clavulânico (AMC, 30 μ g), cefalotina (KF,30 μ g), amicacina (AK,30 μ g), estreptomicina (S,10 μ g), ácido nalidíxico (NA,30 μ g), cloranfenicol (C,30 μ g), tobramicina (TOB, 10 μ g), sulfametoxazol/trimetoprima (SXT,25 μ g) e kanamicina (K,30 μ g). As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Foi observada a forma dos halos dos antibióticos aztreonam, cefotaxima, ceftazidina e amoxicilina com ácido clavulânico para inferir sobre a possibilidade do isolado ser produtor de ESBL, verificando-se a deformação dos halos destes antibióticos (teste da aproximação de discos) (Drieux, Brossier, Sougakoff, & Jarlier, 2008). A interpretação e medição do diâmetro dos halos de inibição fez-se segundo as recomendações e pontos de viragem do CLSI. Estes antibióticos foram seleccionados de acordo com as características intrínsecas dos dois microrganismos e porque são prescritos tanto na medicina humana como na veterinária, e representam as diferentes classes de antibióticos (Goossens, Ferech, Vander Stichele, & Elseviers, 2005.). “*Multiple drug resistance*” (MDR) foi definida como a resistência a três ou mais antibióticos, independentemente da classe.

2.6. Extração de DNA de bactérias gram-positivo

Depois de uma pré-identificação de espécies de enterococos através das suas características fenotípicas, foram repicadas colónias puras de cada placa de MH para tubos com 5 mL de *Brain Heart Infusion Broth* (BHI; Biokar Diagnostics), um meio líquido que permite um grande crescimento de diversos microrganismos, e incubou-se a 37°C por 24h, para realizar a extração de DNA bacteriano. Após essas 24h retirou-se 1 mL de cada tubo para *ependorfs* estéreis e centrifugou-se durante 10 minutos a 7000 rpm (microcentrifuga Sigma 1-14). Depois da primeira centrifugação rejeitou-se o sobrenadante e adicionou-se ao *pellet* 1 mL de água destilada, voltando-se a centrifugar por 10 minutos a 7000 rpm para proceder à lavagem do *pellet*. Após a centrifugação o sobrenadante foi rejeitado e ressuspendeu-se o *pellet* em 500 μ L de tampão SET- *Sodium chloride-EDTA-Tris* (75mM NaCl (Merck), 25mM EDTA pH8 (AppliChem), 20mM Tris Buffer pH7,5 (AppliChem)) e 25 μ L de Dodecil Sulfato de Sódio - SDS a 20% (Sigma-Aldrich) misturando-se suavemente. A extração de DNA bacteriano de bactérias gram-positivo, nomeadamente de enterococos, é mais difícil devido a uma maior dificuldade de degradar a parede celular bacteriana, devido à presença de uma grossa camada de peptidoglicano. Desta forma a extração exigiu duas etapas, em primeiro lugar adicionou-se 25 μ L de lisostafina (1 mg/mL; Sigma-Aldrich) e deixou-se incubar durante duas horas numa estufa a 37°C. Após essas duas horas acrescentou-se 2,5 μ L de proteinase K (20 mg/mL; Bioron) e 2,5 μ L de lisosima (50 mg/mL; AppliChem) e incubou-se novamente a 37°C por mais duas horas (no caso da falta de lisostafina, verificou-se ser possível a extração adicionando-se apenas 2,5 μ L de proteinase K e 4 μ L de lisosima e incubando-se a 37°C por um tempo alargado, até 24h, resultando na mesma eficiência de extração (Ulrich & Hughes, 2001)). Ao fim desse tempo adicionou-se 220 μ L de NaCl a 5M e 700 μ L de clorofórmio: isoamilálcool 24:1 (AppliChem) e agitou-se vigorosamente, sem usar o vortex, até obter uma solução branca homogénea. Centrifugou-se por 10 minutos a 10000 rpm e retirou-se o sobrenadante para outro *ependorf* estéril. Para recuperar este sobrenadante para um novo *ependorf* foi tido especial cuidado para não trazer junto a membrana que se encontra a separar a fase aquosa da fase orgânica, de modo a preservar a pureza da extração. Após retirar o sobrenadante, acrescentou-se a este 700 μ L de isopropanol frio (AppliChem) frio (-20°C), misturou-se suavemente e em seguida deixou-se precipitar por mais uma hora a -

20°C. Após este espaço de tempo, procedeu-se a uma centrifugação durante 10 minutos a 10000 rpm e retirou-se o sobrenadante sem tocar no *pellet* que se formou. Ressuspendeu-se o *pellet* em 800 μ L de etanol (Merck) a 70% frio (-20°C) para o lado contrario do *pellet* e centrifugou-se novamente durante 5 minutos a 10 000 rpm. Por fim removeu-se o etanol e deixou-se secar o DNA precipitado ou ar. Posteriormente, adicionou-se um volume de 100 μ L de água destilada e guardou-se a 4°C (quando o período de tempo de armazenamento era grande, foi preferível guardar a -20°C). O DNA foi quantificado no Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). A obtenção de DNA foi sempre aproximadamente 30ng/ μ L. Este método de extração foi o único, excetuando o uso de *kits* de extração, que se verificou ser capaz de permitir uma extração bem sucedida, embora resultando numa quantidade de DNA baixa. A confirmação de extração de DNA pode ainda ser observada através de uma corrida de 5 μ L de solução de extração, em gel de agarose (SeaKem), observando-se uma banda de elevado peso molecular, representativa do DNA, sob luz UV (Figura 4).

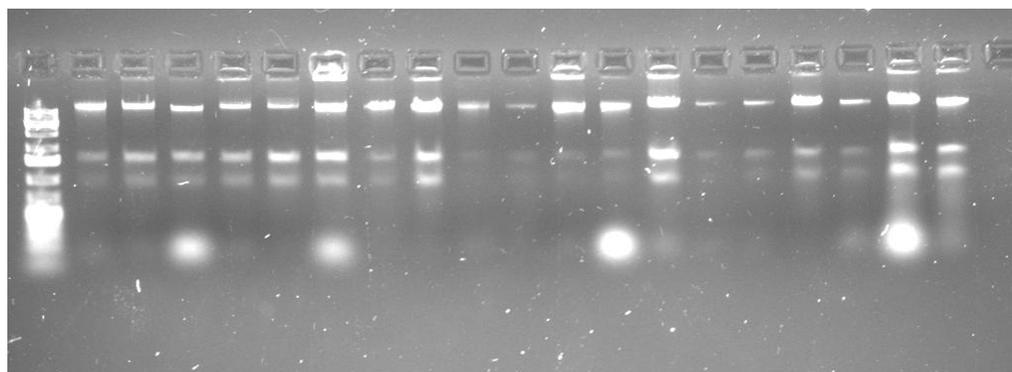


Figura 4 - Imagem representativa das corridas de electroforese realizadas para confirmação da extração de DNA, observando-se uma banda de elevado peso molecular correspondente ao DNA genómico bacteriano, e duas bandas representantes do RNA ribossomal. Electroforese em gel de agarose 1,5%, 150V, 20min. Gel corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL).

2.7. Extração de DNA de bactérias gram-negativo

Vários métodos foram testados para a extração de DNA bacteriano a partir de *E. coli*. Inicialmente procedeu-se à extração térmica. Para tal, a partir de uma cultura pura em placa com menos de 24 h, recolheu-se uma ansa da sementeira e suspendeu-se em 0,5 mL de água destilada estéril. De seguida colocaram-se os *ependorfs* num banho-maria de água fervente a 95 °C durante 20 minutos. Passado esse tempo agitou-se a solução vigorosamente no vortex e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Por fim centrifugaram-se as amostras a 12000 rpm durante 2 min e recolheu-se o sobrenadante, contendo o DNA, para um novo *ependorf* estéril. Com este método de extração obtinha-se grande quantidade de DNA, no entanto também elevada quantidade de impurezas, observadas pela razão A_{260}/A_{280} aquando da quantificação do DNA em solução no Nanodrop, sendo necessária uma purificação com um *kit* adequado para melhores resultados nos subseqüentes estudos em PCR.

Foi também realizada extração química, a qual consiste num protocolo idêntico ao referido anteriormente para bactérias gram-positivo, variando apenas no facto de não ser utilizada a lisostafina, por ser uma extração mais fácil, e na redução dos tempos de incubação a 37°C para apenas uma hora. Esta tipo extração, quando bem realizado, originava um produto relativamente puro, no entanto, com uma pequena quantidade de DNA extraído.

Foi também testado um terceiro método, o qual se verificou ser o mais prático e eficiente, obtendo-se sempre grande quantidade de DNA extraído, num volume que possibilita várias utilizações e com uma pureza significativa, permitindo resultados fiáveis aquando da amplificação por PCR. Para este método foi utilizado um composto da Bio-Rad, o *InstaGene Matrix*[®], o qual consiste numa matriz de resina, negativamente carregada, que quelata metais existentes em solução, tais como o magnésio, que são necessários como cofatores de reações enzimáticas que degradariam o DNA, após várias enzimas responsáveis pela degradação de DNA invasor serem libertadas pela lise celular e se encontrarem em solução com este. Além disso, ao se ligarem a esses cofatores, inibidores das reações de PCR, em vez do DNA, previne a perda de DNA devido a ligações irreversíveis. Essa matriz absorve assim os produtos da lise celular que interferem com a amplificação por PCR, por contribuírem como impurezas da extração, depositando-se juntamente com a matriz, por centrifugação, originando um sobrenadante com DNA genómico intacto em solução, que é utilizado nas reações de PCR.

Para a extração por este método, depois da confirmação da presença e da pureza da amostra, e seguindo as instruções do fabricante, recolheu-se uma ansa da sementeira, ressuspendendo-a em 1mL de água autoclavada num *ependorf*, sendo de seguida centrifugada durante 2 minutos a 12.000 rpm, removendo-se posteriormente o sobrenadante. De seguida adicionou-se 200 μ L de *InstaGene Matrix*[®] ao ao *pelett* e incubou-se a 56°C durante 30 minutos. Esta pré-incubação tem como objetivo a inativação de DNAses e iniciar o enfraquecimento da parede e membrana plasmática. Após este tempo levou-se ao vortex a alta velocidade por 10s e colocaram-se os *ependorfs* num bloco de aquecimento (Bio TDB-100) a 100°C por 8 minutos, para provocar a lise celular e libertação do conteúdo, onde se inclui o DNA. Para finalizar a extração, agitou-se a solução no vortex a alta velocidade por 10s e centrifugou-se a 12.000 rpm durante 3 minutos, depositando a matriz e deixando um sobrenadante com o DNA genómico extraído. O que não foi imediatamente usado, guardou-se a -20°C. O DNA foi quantificado no Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). A obtenção de DNA foi sempre aproximadamente 300ng/ μ L. Mais uma vez, a confirmação de extração de DNA pode ainda ser observada através de uma corrida de 5 μ L de solução de extração, em gel de agarose (SeaKem), observando-se sob luz UV uma banda de elevado peso molecular, representativa do DNA extraído (Figura 5 e 6).

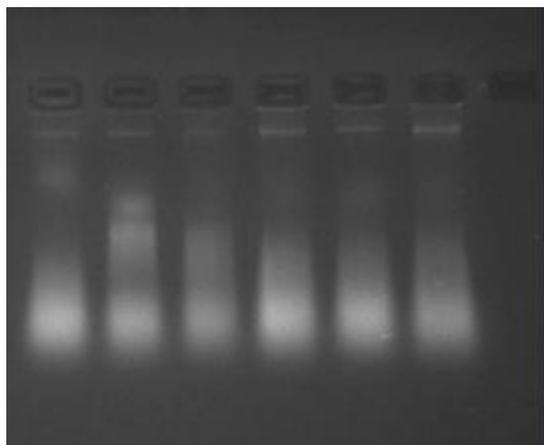


Figura 5 - Imagem representativa das corridas de electroforese para confirmação da extração de DNA, observando-se a banda de elevado peso molecular correspondente ao DNA genómico bacteriano, extraído termicamente. Electroforese em gel de agarose 1,5%, 150V, 20min. Gel corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL).

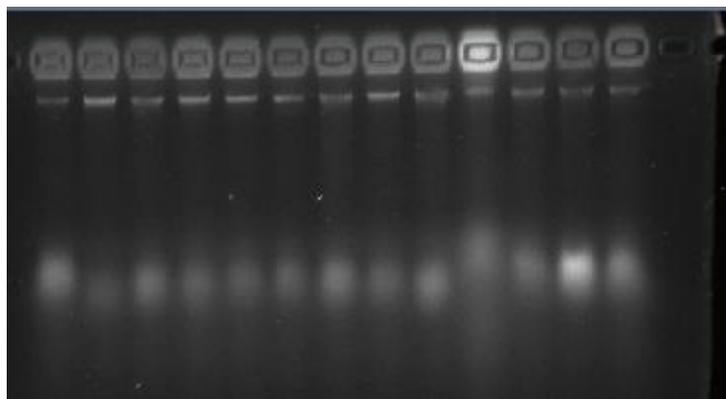


Figura 6 - Imagem representativa das corridas de electroforese para confirmação da extração de DNA, observando-se a banda de elevado peso molecular correspondente ao DNA genómico bacteriano extraído com *InstaGene Matrix*[®]. Electroforese em gel de agarose 1,5%, 150V, 20min. Gel corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL)

2.8. Identificação de filogrupos de *E. coli* por Multiplex PCR

A determinação dos filogrupos das estirpes de *E. coli* decorreu com base no trabalho de Clermont et al. 2000, com algumas adaptações. A reação ocorreu num volume final de 25 μ L, e foram utilizados os três conjuntos de primers que identificam, entre si, os filogrupos de *E. coli*. Os primers utilizados e respetivas sequências nucleotídicas encontram-se enumerados no Quadro V. A reação de multiplex PCR foi realizada na presença de Buffer 1x (16,0 mM (NH₄)₂SO₄, 67,0 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.01 % Tween-20, 2,5 mM MgCl₂; Bioron), 0,2mM de cada dNTP (4you4 dNTP Mix; Bioron), 3mM de cloreto de magnésio (Bioron), 0,4pmol/ μ L de cada primer *forward* e *reverse* (metabion), 1,25U de DNA Taq polimerase (5u/ μ L;Bioron), e 2 μ L de DNA bacteriano. O volume foi completado com água destilada e esterilizada. A amplificação decorreu no termociclador *Mycycler* da Bio-Rad, e os ciclos de amplificação consistiram em: desnaturação inicial a 94°C 5min, seguido de 30 ciclos de: desnaturação a 94°C 30s, emparelhamento a 55°C 30s, extensão a 72°C 30s, seguido de uma extensão final de 7min a 72°C. Em cada PCR foram utilizados um controlo positivo (amostra com amplificação dos três genes, filogrupo B2) e negativo (ausência de DNA) para correta interpretação dos resultados.

Os produtos de PCR foram submetidos a uma corrida de electroforese em gel de agarose 1,5% (Seakem Agarose) em tampão TBE 1x, durante 45min a 150V, em tinas de electroforese da Bio-Rad. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e foi revelado no Bio-Rad *Molecular Imager Gel Doc XR*. Foi utilizado 0,5 μ g de *GeneRuler 1kb plus DNA Ladder* (0,1 μ g/ μ L; Thermo Scientific) como marcador de peso molecular de DNA.

A identificação dos filogrupos foi possível pela verificação de bandas num dos três pesos possíveis, cada um correspondente a um amplificação (Figura 7). Para a interpretação dos resultados utilizou-se a chave dicotómica criada por Clermont e colaboradores, como mencionado no Capítulo I- Introdução. De acordo com um estudo mais recente de Gordon, Clermont, Tolley, & Denamur, 2008, os isolados que não amplificam nenhum dos três genes devem ser classificados como não sendo possíveis de tipificar (NT).

Quadro V – Primers utilizados, respectivas sequências e tamanho dos amplicões obtidos, para determinação dos filogrupos das estirpes de *E. coli*.

Primer	Sequência nucleotídica (5'-3')	Amplicão (pb)	Referência
<i>chuA</i>	ChuA1 - GACGAACCAACGGTCAGGAT ChuA2 - TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279pb	Clermont et al., 2000
<i>yjaA</i>	YjaA1 - TGAAGTGTGTCAGGAGACGCTG YjaA2 - ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211pb	
TspE4C2	TspE4C2.1 - GAGTAATGTCTGGGGCATTCA TspE4C2.2 - CGCGCCAACAAAGTATTACG	152pb	

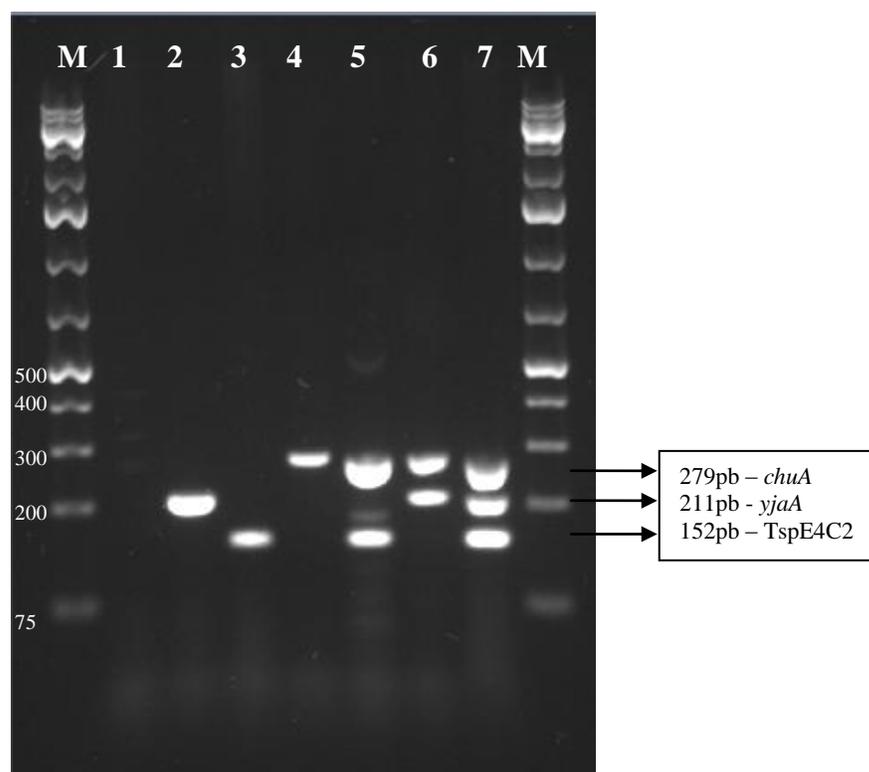


Figura 7 - Imagem obtida neste trabalho e representativa dos possíveis conjuntos de amplificação obtidos por multiplex PCR das sequências que caracterizam os diferentes filogrupos. Poço 1 e 2 – grupo A, poço 3 – grupo B1, poço 4 e 5-grupo D, poço 6 e 7 – grupo B2, M- marcador de peso molecular.

2.9. Identificação das espécies de *Enterococcus* por Multiplex PCR

A determinação de algumas das várias espécies de *Enterococcus* spp. decorreu com base no trabalho de Jackson, Fedorka-Cray, & Barrett, 2004, com algumas adaptações. Como existem muitas espécies, o número de primers para a sua identificação também se torna elevado, assim não é possível realizar uma identificação através de um só multiplex PCR pois, os primers podem emparelhar entre si, além disso apresentam temperaturas de emparelhamento diferentes, e alguns deles originam amplicões com pesos moleculares semelhantes não sendo possível a sua distinção através da visualização das bandas de amplificação no gel de electroforese, quando os vários genes para distinção das espécies são amplificados conjuntamente. Assim, e de acordo com o trabalho mencionado anteriormente, dividiram-se as reações de PCR em sete grupos de espécies, identificadas no quadro VI, com dois protocolos diferentes de amplificação.

Quadro VI- Divisão por grupos das reações de multiplex PCR e respetivos primers utilizados para a determinação das diferentes espécies de *Enterococcus* spp., seqüências nucleotídicas e tamanho dos amplicões obtidos.

Espécies por grupos	Primer e Sequência nucleotídica (5'-3')	Amplicão (pb)	Referência
Grupo 1			
<i>E. durans</i>	DU1 - CCTACTGATATTAAGACAGCG DU2 - TAATCCTAAGATAGGTGTTTG	295	Jackson et al. 2004
<i>E. faecalis</i>	FL1 - ACTTATGTGACTAACTTAACC FL2 - TAATGGTGAATCTTGGTTTGG	360	
<i>E. faecium</i>	FM1- GAAAAACAATAGAAGAATTAT FM2 - TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA	215	
<i>E. malodoratus</i>	MA1 - GTAACGAACCTGAATGAAGTG MA2 - TTGATCGCACCTGTTGGTTTT	134	
Grupo 2			
<i>E. casseliflavus</i>	CA1- TCCTGAATTAGGTGAAAAAAC CA2- GCTAGTTTACCGTCTTTAACG	288	Jackson et al. 2004
<i>E. gallinarum</i>	GA1- TTAAGTGGTGAATTTGATTCG GA2- TGAATCTTCTTTGAAATCAG	173	
Grupo 3			
<i>E. dispar</i>	DI1- GAACTAGCAGAAAAAGTGTG DI2- GATAATTTACCGTATTTACC	284	Jackson et al. 2004
<i>E. pseudoavium</i>	PV1- TCTGTTGAGGATTTAGTTGCA PV2- CCGAAAGCTTCGTCAATGGCG	173	
<i>E. saccharolyticus</i>	SA1- AAACACCATAACACTTATGTG SA2- GTAGAAGTCACTTCTAATAAC	371	
Grupo 4			
<i>E. flavescens</i>	FV1- GAATTAGGTGAAAAAAAAGTT FV2- GCTAGTTTACCGTCTTTAACG	284	Jackson et al. 2004
<i>E. mundtii</i>	MU1- CAGACATGGATGCTATTCCATCT MU2- GCCATGATTTTCCAGAAGAAT	98	
Grupo 5			
<i>E. avium</i>	AV1- GCTGCGATTGAAAAATATCCG AV2- AAGCCAATGATCGGTGTTTTT	368	Jackson et al. 2004
<i>E. colombae</i>	CO1- GAATTTGGTACCAAGACAGTT CO2- GCTAATTTACCGTTATCGACT	284	
Grupo 6			
<i>E. cecorum</i>	CE1- AAACATCATAAACCTATTTA CE2- AATGGTGAATCTTGGTTCGCA	371	Jackson et al. 2004
<i>E. hirae</i>	HI1- CTTTCTGATATGGATGCTGTC HI2- TAAATCTTCTTAAATGTTG	187	
<i>E. raffinosus</i>	RF1- GTCACGAACCTGAATGAAGTT RF2- AATGGGCTATCTTGATTCGCG	287	
Grupo 7			
<i>E. gilvus</i>	GI1- CTGGCTGGGCTTGGCTAGTGA GI2- ATAATCGGTGTTTTACCGTCT	98	Jackson et al. 2004
<i>E. porcinus/villorum</i>	PO1- TGGTTTCTGATATGGATGCGA PO2- GTAATCGCTAATTTCTCTCCA	280	

A reação ocorreu num volume final de 25 μ L, e foram utilizados os primers anteriormente referidos. A reação de multiplex PCR foi realizada na presença de *buffer* 1x (16,0 mM (NH₄)₂SO₄, 67,0 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.01 % Tween-20, 2,5 mM MgCl₂ ; Bioron), 0,2mM de cada dNTP (4you4 dNTP *Mix*; Bioron), 3mM de cloreto de magnésio (Bioron) , 0,8 μ mol/ μ L de cada primer *forward e reverse* (metabion), 1,25U de DNA Taq polimerase (5u/ μ L;Bioron), e 5 μ L de DNA bacteriano . O volume foi completado com água destilada e esterilizada. A amplificação decorreu no termociclador *Mycycler* Bio-Rad, e os dois protocolos diferentes de amplificação utilizados foram: i) para grupo 1,2,5 e 6: desnaturação inicial a 95°C 4min, seguido de 30 ciclos de: desnaturação a 95°C 30s, emparelhamento a 55°C 1min, extensão a 72°C 1min, seguido de uma extensão final de 7min a 72°C; ii) para os grupos 3,4 e 7: desnaturação inicial a 95°C 4min, seguido de 30 ciclos de: desnaturação a 95°C 30s, emparelhamento a 60°C 1min, extensão a 72°C 1min, seguido de uma extensão final de 7min a 72°C. Em cada PCR foram utilizados um controlo positivo (de cada espécie, se necessário) e negativo (ausência de DNA) para correta interpretação dos resultados.

Os produtos de PCR foram submetidos a uma corrida de electroforese em gel de agarose 1,5% (Seakem Agarose) em tampão TBE 1x, durante 45min a 150V, em tinas de electroforese da Bio-Rad. O gel foi corado brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e revelado no Bio-Rad *Molecular Imager Gel Doc XR*. Foi utilizado 0,5 μ g de *GeneRuler 1kb plus DNA Ladder* (0,1 μ g/ μ L; Thermo Scientific) como marcador de peso molecular de DNA. A identificação das espécies foi possível pela verificação de bandas nos pesos respetivos de cada uma das espécies listadas no quadro VI.

2.10. Caracterização molecular dos genes que codificam resistências a β -lactâmicos por multiplex PCR

A caracterização molecular dos genes responsáveis por conferir resistência aos β -lactâmicos foi efetuada com base no trabalho de Dalenne, Da Costa, Decré, Favier, & Arlet, 2010, onde foram desenhados primers e otimizados protocolos de multiplex PCR, divididos em vários grupos, para pesquisa dos genes de β -lactamases mais frequentes e responsáveis por conferir resistência a esta classe de antibióticos (β -lactâmicos). Para este trabalho foram

pesquisados apenas os grupos genes de resistência mencionados no quadro VII. Separadamente, por simplex PCR, foram também pesquisados os genes CTXM-15, pois a sua presença em humanos e em animais, é cada vez mais frequente (Ewers, Grobbel, Bethe & Sebastian, 2011).

A reação ocorreu num volume final de 25 μ L, tendo sido utilizados os primers com as sequências referidas no quadro VII. As reações tanto de multiplex como simplex PCR foram realizadas na presença de *Buffer* 1x (50,0 mM KCl, 10,0 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.01 % Tween-20, 1,5 mM MgCl₂ ; Bioron), 0,2mM de cada dNTP (4you4 dNTP *Mix*; Bioron), 1,5mM de cloreto de magnésio (Bioron) , entre 0,2 e 0,5pmol/ μ L de cada primer *forward e reverse* (metabion) (Quadro VII) , 1U de DNA Taq polimerase (5u/ μ L;Bioron), e 2 μ L de DNA bacteriano . O volume foi completado com água destilada e esterilizada. A amplificação decorreu no termociclador *Mycycler* Bio-Rad, e o protocolo de amplificação utilizado foi: desnaturação inicial a 94°C 10min, seguido de 30 ciclos de: desnaturação a 94°C 40s, emparelhamento a 60°C (para os 4 grupos de multiplex PCR), 50°C (para CTXM-15), durante 40s, extensão a 72°C 1min, seguido de uma extensão final de 7min a 72°C. Em cada PCR foram utilizados um controlo positivo (para a presença de cada gene, se necessário) e negativo (ausência de DNA) para correta interpretação dos resultados.

Os produtos de PCR foram submetidos a uma corrida de electroforese em gel de agarose 1,5% (Seakem Agarose) em tampão TBE 1x, durante 50min a 150V, em tinas de electroforese da Bio-Rad. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e revelado no Bio-Rad *Molecular Imager Gel Doc XR*. Foi utilizado 0,5 μ g de *GeneRuler 1kb plus DNA Ladder* (0,1 μ g/ μ L; Thermo Scientific) como marcador de peso molecular de ADN.

Quando necessária a confirmação do gene em questão ou verificação da presença de mutações, os produtos de PCR eram purificados utilizando o *kit GRS PCR & Gel Band Purification* (GRiSP *Research Solutions*), posteriormente sequenciados (Macrogen), e as sequências eram alinhadas com sequências de genes de β -lactamases já conhecidos, inseridas no GenBank.

Quadro VII – Divisão por grupos das reações de PCR multiplex, utilizados para a determinação molecular de genes de β -lactamases e respetivas sequências nucleotídicas, tamanho dos amplicões obtidos, e concentração de primer a utilizar. Y= T ou C; R= A ou G; S= G ou C; D= A ou G or T. F=*forward*, R=*reverse*.

PCR Multiplex	β -lactamases alvo	Primer	Amplicação (pb)	Sequencia nucleotidica (5'-3')	[primer] (pmol/ μ L)	Referências
TSO	TEM (TEM-1, TEM-2)	TSO-T	800	F-CATTTCCTGTCGCCCTTATTC R-CGTTTCATCCATAGTTGCCTGAC	0,4	Dallenne et al., 2010
	SHV (SHV-1)	TSO-S	713	F-AGCCGCTTGAGCAAATTAAC R-ATCCCGCAGATAAATCACCAC	0,4	
	OXA (OXA-1, OXA-4, OXA-30)	TSO-O	564	F-GGCACCAGATTCAACTTCAAG R-GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG	0,4	
CTX-M-1/2/9	CTX-M-1 (CTX-M-1 CTX-M-3 CTX-M-15)	CTX-M-1 CTX-M-1-2	688	F-TTAGGAARTGTGCCGCTGYA R-CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	0,4 0,2	
	CTX-M-2 (CTX-M-2)	CTX-M-2 CTX-M-1-2	404	F-CGTTAACGGCACGATGAC R-CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	0,2	
	CTX-M-9 (CTX-M-9 CTX-M-14)	CTX-M-9	561	F-TCAAGCCTGCCGATCTGGT R-TGATTCTCGCCGCTGAAG	0,4	
CTX-M-8/25	CTX-M-8 CTX-M-25 (CTX-M-26 CTX-M-39 CTX-M-41)	CTX-M-8-25	326	F-AACRCRCAGACGCTCTAC R-TCGAGCCGGAASGTGYAT	0,4	
AmpC plasmídeo	ACC (ACC-1 ACC-2)	ACC	346	F-CACCTCCAGCGACTTGTTAC R-GTTAGCCAGCATCACGATCC	0,2	
	FOX (FOX 1 A 5)	FOX	162	F-CTACAGTGC GG GTGGTTT R-CTATTGCGCCAGGTGA	0,5	
	MOX/CMY (MOX-1 MOX-2 CMY-1 CMY-8 A CMY-11 CMY-19)	MOX	895	F-GCAACAACGACAATCCATCCT R-GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA	0,2	
	DHA (DHA-1, DHA-2)	DHA	997	F-TGATGGCACAGCAGGATATTC R-GCTTTGACTCTTTCGGTATTCG	0,5	
	CIT (LAT-1 A 3 BIL-1 CMY-2 A 7 CMY-12 A 18 CMY-21 A 23)	CIT	538	F-CGAAGAGGCAATGACCAGAC R-ACGGACAGGGTTAGGATAGY	0,2	
	EBC (ACT-1, MIR-1)	EBC	683	F-CGGTAAAGCCGATGTTGCG R-AGCCTAACCCCTGATACA	0,2	

CTX-M-15	CTX-M-15	CTXM-15	875	F- AGAATAAGGAATCCCATGGTT R- ACCGTCGGTGACGATTTTAG	0,4	Mendonça, Leitão, Manageiro, Ferreira, & Caniça, 2007
----------	----------	---------	-----	---	-----	---

2.11. Deteção de genes de resistência a quinolonas

A caracterização molecular dos genes cromossomais, ou presentes em plasmídeos, responsáveis por conferir resistência às quinolonas foi realizada em parceria com o Centro de Biotecnologia e Química Fina da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto. As reações de PCR ocorreram num volume final de 50 μ L (volume necessário para sequenciação do produto) ou 12,5 μ L (quando apenas para deteção de genes), e foram utilizados os primers com as sequências referidas no quadro VIII. As reações ocorreram na presença de *Buffer* 1x (10,0mM Tris-HCl pH 8.8, 50,0mM KCl, 0,8% v/v Nonidet P40; Thermo Scientific), 0,2mM de cada dNTP (dNTP Mix; Thermo Scientific), 1,5mM ou 3mM (apenas para *qepA*) de cloreto de magnésio (Thermo Scientific), 1pmol/ μ L de cada primer *forward e reverse* (STABVIDA) (*gyrA*, *parC*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*), 0,4pmol/ μ L (*qnrC*, *qnrD*) e 2pmol/ μ L (*qepA*), 1,5U de DNA Taq polimerase (5U/ μ L; Thermo Scientific), 5 μ L de DMSO (apenas para *qepA*) e 5 μ L de DNA bacteriano (em volumes de reação de 50 μ L, ou 1 μ L para reações em volumes menores). O volume foi completado com água destilada e esterilizada. A amplificação decorreu no termociclador Biometra TPersonal, e os protocolos de amplificação utilizados foram: *gyrA e parC* - desnaturação inicial a 95°C 5min, seguido de 35 ciclos de: desnaturação a 94°C 1min, emparelhamento a 50°C 1min, extensão a 72°C 1min, seguido de uma extensão final de 15min a 72°C. Para *qnrA*, *qnrB e qnrS* - desnaturação inicial a 95°C 8min, seguido de 35 ciclos de: desnaturação a 95°C 45s, emparelhamento a 54°C 45s, extensão a 72°C 45s, seguido de uma extensão final de 8min a 72°C. *qnrC* - desnaturação inicial a 94°C 5min, seguido de 30 ciclos de: desnaturação a 94°C 30s, emparelhamento a 50°C 30s, extensão a 72°C 30s, seguido de uma extensão final de 10min a 72°C. Para *qnrD e aac(6')-Ib* - desnaturação inicial a 94°C 5min, seguido de 30 ciclos de: desnaturação a 94°C 45s, emparelhamento a 55°C 45s, extensão a 72°C 45s, seguido de uma extensão final de 10min a 72°C. E para *qepA*- desnaturação inicial a 94°C 4min, seguido de 30 ciclos de: desnaturação a 94°C 1min, emparelhamento a 56°C 1min, extensão a 72°C 1min, seguido de

uma extensão final de 7min a 72°C. Em cada PCR foram utilizados um controlo positivo e negativo (ausência de DNA) para correta interpretação dos resultados.

Os produtos de PCR foram submetidos a uma corrida de electroforese em gel de agarose 1,5% (Ultra Pure Agarose, Invitrogen) em tampão TAE 1x, durante 35min a 90V, em tinas de electroforese da Bio-Rad. O gel foi corado com Midori Green Advance (*Nippon Genetics*) e revelado no Bio-Rad *Molecular Imager Gel Doc*. Foi utilizado 3 μ L de *GRS Universal Ladder* (*GRiSP Research Solutions*) como marcador de peso molecular de DNA. Mutações pontuais nas sequências dos genes *gyrA*, *parC* foram detetadas por comparação com sequências homologas desses genes, inseridas no GenBank, através de alinhamento por ClustalW no software MEGA 5.10. Para tal, os produtos de PCR foram purificados utilizando o *kit GRS PCR & Gel Band Purification* (*GRiSP Research Solutions*) e posteriormente sequenciados (Macrogen).

Quadro VIII – Primers utilizados para a determinação molecular dos genes de resistência às quinolonas, tanto cromossomal como mediada por plasmídeos, respetivas sequências nucleotídicas e tamanho dos amplicões obtidos. M = A or C; H = A or C or T; Y=C or T . F=*forward*, R=*reverse*,

Genes alvo	Primer	Amplicação (pb)	Sequência nucleotídica (5'-3')	Referências
<i>gyrA</i>	gyrA6 gyrA631R	626	F- CGACCTTGCGAGAGAAAT R- GTTCCATCAGCCCTTCAA	McDonald et al., 2001
<i>parC</i>	HJL3 HJL4	594	F- AATGAGCGATATGGCAGAGC R- CTGGTCGATTAATGCGATTG	
<i>qnrA</i>	qnrA-FM qnrA-RM	580	F-AGAGGATTTCTCACGCCAGG R-TGCCAGGCACAGATCTTGAC	Cattoir, Poirel, Rotimi, Soussy, & Nordmann, 2007
<i>qnrB</i>	qnrB-FM qnrB-RM	264	F-GGMATHGAAATTCGCCACTG R-TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA	
<i>qnrC</i>	qnrC-F qnrC-B	447	F-GGGTTGTACATTTATTGAATC R-TCCACTTTACGAGGTTCT	Wang et al., 2009
<i>qnrD</i>	qnrD-F qnrD-B	582	F-CGAGATCAATTTACGGGGAATA R-AACAAGCTGAAGCGCCTG	Cavaco, Hasman, Xia, & Aarestrup, 2009
<i>qnrS</i>	qnrS-FM qnrS-RM	428	F-GCAAGTTCATTGAACAGGGT R-TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	Cattoir et al., 2007
<i>aac(6)-Ib</i>	aac(6')-Ib-F aac(6')-Ib-R	482	F-TTGCATGCTCTATGAGTGGCTA R-CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	Park, Robicsek, Jacoby, Sahm, & Hooper, 2006
<i>qepA</i>	qepA-F qepA-R	1137	F-TGGTCTACGCCATGGACCTCA R-TGAATTCGGACACCGTCTCCG	Périchon, Courvalin, & Galimand, 2007

2.12. ERIC PCR

Para a caracterização da relação filogenética e comparação genotípica entre amostras, foram identificadas as sequências ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) do genoma bacteriano dos isolados selecionados, utilizando PCR. O protocolo foi otimizado tendo como base o trabalho de Versalovic, Koeuth, & Lupski, 1991, de modo diferente para amostras de *E. coli* e *Enterococcus* spp., pois estes além de apresentarem uma extração de DNA mais difícil, também apresentavam uma amplificação mais fraca, necessitando de um protocolo de amplificação mais longo. A reação de ERIC-PCR pode ser realizada com a utilização de um ou ambos os primers (Dunne & Wang, 1997; Jurkovic et al., 2007; Meacham et al., 2003; Versalovic et al., 1991), para este trabalho foram utilizados ambos por parecer demonstrar maior poder discriminatório do que quando utilizado apenas um.

A reação de PCR ocorreu num volume final de 25 μ L, e foram utilizados os primers ERIC-1R e ERIC2. Os primers utilizados e respetivas sequências encontram-se enumerados no Quadro IX. A reação de multiplex PCR foi realizada na presença de *Buffer* 1x (16,0 mM (NH₄)₂SO₄, 67,0 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.01 % Tween-20, 2,5 mM MgCl₂ ; Bioron), 0,2mM de cada dNTP (4you4 dNTP Mix; Bioron), 5mM de cloreto de magnésio (Bioron) , 0,8pmol/ μ L (*Enterococcus*) e 0,4pmol/ μ L (*E. coli*) de cada primer (metabion), 2U de DNA Taq polimerase (5u/ μ L; Bioron), e 10 μ L de DNA bacteriano para *Enterococcus* ou 5 μ L no caso de DNA de *E. coli* . O volume foi completado com água destilada e esterilizada. A amplificação decorreu no termociclador *Mycycler* Bio-Rad, e os ciclos de amplificação para ERIC PCR em *Enterococcus* spp. consistiram em: desnaturação inicial a 95°C 7min, seguido de 35 ciclos de: desnaturação a 95°C 30s, emparelhamento a 48°C 1min, extensão a 65°C 8min, seguido de uma extensão final de 16min a 65°C (adaptado de Wei, Pan, Du, Chen, & Zhao, 2004). Para *E. coli*, os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C 3min, seguido de 30 ciclos de: desnaturação a 94°C 1min, emparelhamento a 50°C 1min, extensão a 72°C 3min, seguido de uma extensão final de 5min a 72°C (Leung et al., 2004). Em cada PCR foram utilizados um controlo negativo (ausência de DNA) para correta interpretação dos resultados.

Os produtos de PCR foram submetidos a uma corrida de electroforese em gel de agarose 1,5% (Seakem Agarose) em tampão TBE 1x, durante 45min a 150V, em tinas de

electroforese da Bio-Rad. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e revelado no Bio-Rad *Molecular Imager Gel Doc XR*. Foi utilizado 0,5 μ g de *GeneRuler 1kb plus DNA Ladder* (0,1 μ g/ μ L; Thermo Scientific) como marcador de peso molecular de ADN.

Quadro IX - Primers utilizados e respectivas sequências, utilizados para ERIC PCR.

Primer	Sequência nucleotídica (5'-3')	Tamanho do Amplicão	Referência
ERIC	ERIC 1R - ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC ERIC 2 - AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	-	Versalovic et al., 1991

2.13. Electroforese em campo pulsado (PFGE) para *E. coli*

Neste trabalho, para a comparação genotípica de algumas amostras de *E. coli* provenientes de animais de estimação, respetivos proprietários e habitat partilhado, que exibiam perfis de resistência semelhantes, para além do ERIC PCR, foi também realizada tipagem genética com o método de electroforese em campo pulsado (PFGE), em virtude da técnica ser conhecida como o “*gold standard*” e por permitir um estudo mais discriminatório e reprodutível das relações filogenéticas. O protocolo utilizado baseou-se no trabalho de Barrett et al., 1994, com modificações, e foi apenas otimizado para *E. coli*, sendo que foi testado para *Enterococcus* (com mudança para a enzima mais adequada, SmaI) sem sucesso, necessitando assim de posterior otimização das soluções para extração de DNA.

Para cada corrida de electroforese foram selecionadas e tratadas apenas 14 amostras de cada vez, pois o molde de agarose possui apenas 15 poços. Inicialmente procedeu-se à habitual certificação da presença e pureza da amostra de *E. coli* através de uma sementeira por esgotamento em TBX Agar, incubada a 37°C. Após crescimento e verificação de colónias isoladas foi repicada uma e realizado um riscado em meio MH, e incubado a 37°C por 24h. No dia seguinte, foi picada uma colónia isolada para um tubo de APT de 10mL e incubado *overnight* a 37°C. Após crescimento e verificação de turvação do meio, mediam-se os valores de absorvância das culturas em APT, que se deveriam encontrar semelhantes e com valores entre 0,5 e 1, a um comprimento de onda de 600nm. Em caso de diferenças na absorvância,

efetuavam-se diluições e incubação, em novos tubos de APT, a 37°C num banho com agitação. Deste modo garantia-se a presença de número semelhante de células bacterianas e respetivamente DNA, em todas as amostras. Desse caldo final, centrifugou-se 1,5mL a 10000rpm durante 5 min. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 750 μ L de água estéril e procedeu-se a nova centrifugação. Após rejeição do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspendido em 150 μ L de Tampão de Suspensão (10mM Tris Buffer pH7.5 (AppliChem), 20mM NaCl (Merck), 50mM EDTA pH8.0 (AppliChem)) e foi adicionado 150 μ L de agarose LMP 2% (SeaPlaque Agarose *low melting temperature*) fundida, sendo que ambas as soluções estavam bem equilibradas a 50°C. A solução foi bem homogeneizada, para boa distribuição da agarose. Após esta fase, segue-se a preparação dos *plugs* de agarose contendo a amostra bacteriana. Para tal, manteve-se os *ependorfs* num banho seco (Bio TDB-100) a 50°C para que a agarose não gelificasse, enquanto se preparou o material para a construção dos *plugs* (não foram utilizados os moldes comuns da Bio-Rad). Para tal utilizou-se uma placa de vidro forrada com parafilme e lâminas de microscópio bem limpas com etanol a 70%. Para cada amostra pipetou-se 20 μ L dos *ependorfs* com a suspensão bacteriana em agarose LMP e depositou-se, sem bolhas de ar, entre duas lâminas dispostas horizontalmente, permitindo normalmente fazer 6 *plugs* redondos de 20 μ L para cada amostra. De seguida sobrepôs-se verticalmente uma 3ª lâmina sobre as gotículas, originado assim a sua forma achatada adequada para ser inserida nos poços do gel de agarose *pulsed field*. (Figura 8) Incubou-se a placa de vidro com os *plugs* a 4°C durante 5min, para permitir melhor solidificação.

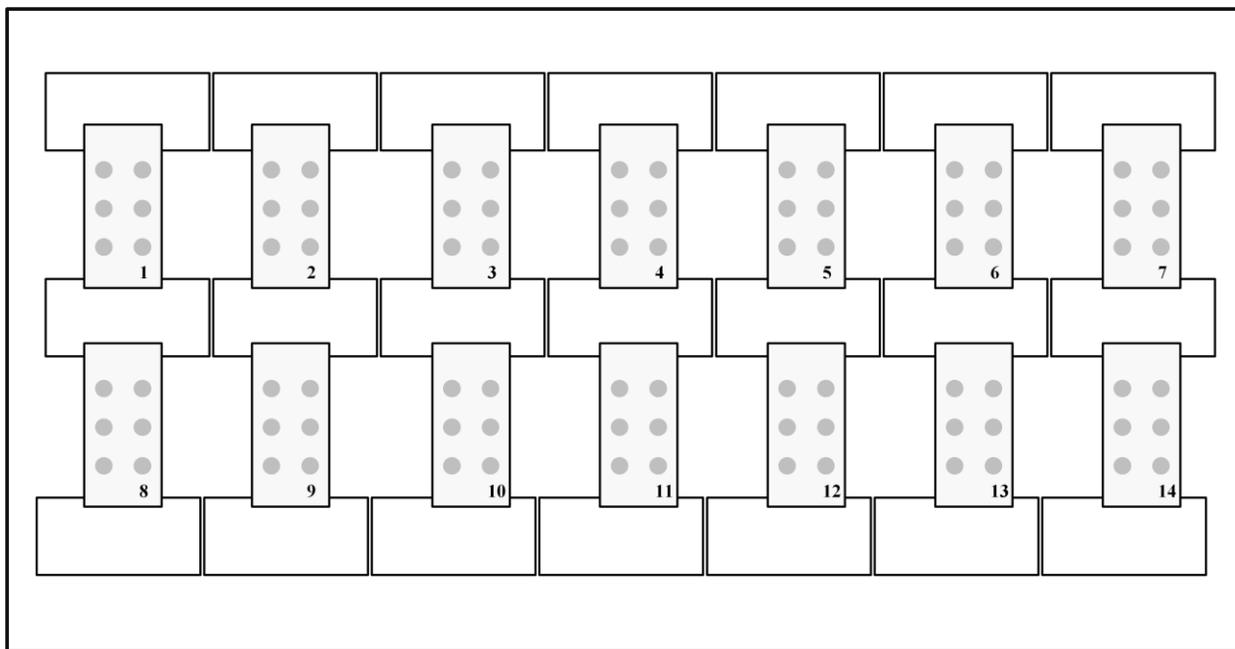


Figura 8 – Representação esquemática do vidro forrado com parafilme e da disposição das lâminas que permitem a formação dos plugs de agarose com suspensão bacteriana, para catorze amostras.

Após este passo, transferiu-se a totalidade dos *plugs* de cada amostra para novos *ependorfs* e adicionou-se, a cada um, 1 mL de Tampão de Lise (10mM Tris Buffer pH7.5 , 50mM NaCl, Na deoxycholato 0.2% (Sigma), Na laurylsarcosine 1% (AppliChem)) com lisozima (AppliChem) na concentração de 1mg/mL e incubou-se a 37°C até os *plugs* ficarem transparentes (no mínimo 2h). Após este período de espera, procedeu-se a uma lavagem dos *plugs* das 14 amostras com 1mL de água destilada estéril, retirando-se de seguida, sem danificar os *plugs*, e adicionando-se 500 μ L de Tampão Proteinase K (100mM EDTA pH8, Na deoxycholato 0.2%, Na laurylsarcosine 1%) com proteinase K (20mg/mL; Bioron) a uma concentração final de 1 mg/mL e incubou-se *overnight* num banho a 50°C. No dia seguinte, trocou-se a solução por 1mL de Tampão de Lavagem (20mM Tris Buffer pH7.5, 50mM EDTA) deixando assim durante 10min, à temperatura ambiente. Substituiu-se, posteriormente, a solução por 1mL de Tampão de Lavagem com PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*; Sigma – solução stock preparada em isopropanol) na concentração final de 0,7mM ,um inibidor da ação das serina proteases, inativando a proteinase K residual, e incubou-se à temperatura ambiente durante 45min. De seguida, descartou-se a solução anterior e lavou-se 3 vezes, com

1mL de Tampão de Lavagem, com incubação de 30min em cada vez. A extração de DNA dentro de cada *plug* e inibição de enzima como DNases terminou e estes puderam ser guardados a 4°C e são conserváveis durante 6 meses, sensivelmente, podendo voltar a ser utilizados em caso de necessidade. Para se realizar a corrida de electroforese em campo pulsado é necessário passar um só *plug* intacto para um novo *ependorf*, deixando os restantes no respetivo Tampão de Lavagem. A este Plug adicionou-se 1mL de Tampão de Lavagem diluído numa proporção de 1:10 e incubou-se à temperatura ambiente durante 30min. Esta etapa com mais fraca concentração em EDTA permite a obtenção de um equilíbrio com o Tampão de Digestão mais rapidamente. Ao fim deste tempo, foi necessário substituir o tampão anterior por 100 μ L de *Buffer* Tango 1X (33 mM Tris-acetate (pH 7.9 a 37°C) , 10 mM Mg-acetate, 66 mM K-acetate, 0.1 mg/mL BSA; Thermo Scientific), que assegura as condições ótimas para a digestão enzimática, com a enzima de restrição que pretendemos utilizar. A presença de BSA melhora a estabilidade de várias enzimas e liga contaminantes que possam ter ficado na preparação do DNA. Incubou-se à temperatura ambiente durante 30min, agitando de vez em quando. Após este período de equilíbrio, substitui-se o tampão anterior por 100 μ L de *Buffer* Tango 1X com a adição da enzima de restrição XbaI (10U/ μ L Thermo Scientific) (Figura 9) à razão de 8U/20 μ L de Plug. Incubou-se *overnight* à temperatura ótima, segundo as recomendações da marca, de 37°C para XbaI (assegurando 100% de atividade).

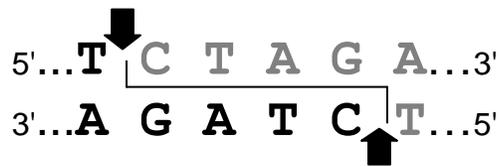


Figura 9 – Sequência de reconhecimento da enzima de restrição XbaI. Gene com origem em *Xanthomonas badrii*.

Após a digestão do DNA com a enzima mencionada, e para observarmos e compararmos o padrão de bandas de DNA, procedeu-se à corrida de electroforese em campo pulsado no equipamento CHEF-DRIII da Bio-Rad. Após lavagem e descontaminação do aparelho, a corrida foi efetuada de acordo com a maioria das publicações, num gel de agarose *pulsed field* a 1% (Bio-Rad) em 3L de TBE 0,5X, e o equipamento programado para uma

corrida a 14°C (necessitando de 2h para estabilização do TBE a esta temperatura), 6V/cm e angulação 120. Para tal, trocou-se a solução de *Buffer Tango* por 1mL de TBE e refrigerou-se enquanto se procedia à montagem do equipamento. Preparou-se o gel, bem fundido e estabilizado a 50°C, seguido de solidificação durante 30min, e inseriu-se o *plug* de cada amostra nos respetivos poços, com a ajuda de uma ansa, iniciando com o marcador de peso molecular (*Lambda Ladder PFG Marker*; New England BioLabs), evitando que os *plugs* ficassem encostados à parte posterior do gel. De seguida, selou-se os poços com agarose LMP 2% bem equilibrada a 50°C, evitando a formação de bolhas de ar no interior dos poços, e deixou-se solidificar. Para as amostras de *E. coli* foram testados alguns protocolos, sendo que o que permitiu melhor diferenciação das bandas foi: 2s – 35s com corrida de 21 horas (Ejrnaes et al., 2006). Após cada três corridas foi mudado o TBE e precedeu-se a uma lavagem do equipamento para evitar contaminações por bactérias e fungos e produção de enzimas que degradem o DNA, alterando a corrida de electroforese. Após a corrida o gel foi corado num banho de brometo de etídio (1 μ g/mL) durante 30min, seguido de lavagem em água destilada por 15min. A leitura e captação de imagem foram feitas no Bio-Rad *Molecular Imager Gel Doc XR*.

Num dos casos estudados, as amostras quando visualizadas sobre luz UV apresentavam-se como um borrão, estando completamente digeridas, pelo que, depois de pesquisa bibliográfica, se percebeu que algumas espécies são incapazes de serem genotipadas por esta técnica devido à degradação do DNA, extraído dentro do *plug* de agarose, durante o extenso procedimento, tendo já outros laboratórios verificado problemas similares com a tipagem por PFGE (Alonso, 2005; Goering, 2010; Sanchez et al., 2002). Este acontecimento parece ser devido à presença de um elevado número de endonucleases que digerem a amostra, e que mantêm uma atividade mesmo após as lavagens com presença de proteinase K. Foi também observado por Ray, Mills, & Dyson, 1995, que compostos derivados do Tris se formam no ânodo durante a electroforese e que isto poderia ser neutralizado pela adição de tioreia, em concentrações entre 50 μ M (Stubbs, Corkill, Graham, & Hart, 2000) e 200 μ M (Fawley & Wilcox, 2002), tanto no buffer quanto no gel. Assim, para estas amostras, procedeu-se à alteração do protocolo, com um aumento de proteinase K em solução, com concentração final de 2 mg/mL, pois elevadas concentrações de proteinase K podem ajudar na digestão de endonucleases mais facilmente, e redução nos períodos de incubação. Adicionou-

se, ainda, 100 μ M de Tiourea (AppliChem) a cada litro de TBE, e no gel, pois verifica-se contribuir como recrutador de radicais Tris responsáveis por parte do problema.

As imagens obtidas dos géis de electroforese foram analisadas com o auxílio do programa informático FPQuest (Bio-Rad, ESTSP, Porto). As bandas foram detetadas pelo *software* e foi feita uma verificação de modo a corrigir deteções erradas. As percentagens de similaridade entre os perfis genotípicos foram calculados utilizando o coeficiente de Dice, e o dendrograma gerado pelo método UPGMA (*unweighted-pair group method*), e para tal foi utilizada uma otimização de 1% e uma tolerância de posição de 2%. Para interpretação da proximidade clonal dos isolados foi utilizado um *cutoff* de 94% do coeficiente de similaridade em que os isolados que apresentassem maior ou igual percentagem seriam considerados clones partilhados, derivados da mesma estirpe. Este *cutoff* foi escolhido por ser o mais consistente com a literatura corrente neste campo (Johnson & Clabots, 2006; Johnson et al., 2008; Stenske et al., 2009). Com base nas recomendações de Tenover et al., 1995, isolados têm proximidade clonal se o seu perfil diferir em mudanças consistentes com um único evento genético (mutação, inserção, deleção) como descrito na introdução, sendo que consiste na variação de, no máximo, 3 bandas, no perfil resultante da tipagem genética, correspondendo a aproximadamente similaridades de 80 a 100 %.

Capítulo III – Resultados e discussão

3.1. Caracterização molecular das resistências aos β -lactâmicos e às quinolonas e determinação dos filogrupos

3.1.1. Determinação dos filogrupos

Anteriormente a este trabalho, os isolados de *E. coli* foram caracterizados fenotipicamente, através da observação das suas características pela utilização de testes bioquímicos, assim como pela observação das colónias cultivadas em meios específicos para *E. coli*. Foram também realizados testes de suscetibilidade antimicrobiana, o que permitiu a identificação das estirpes produtoras de ESBL e resistentes às quinolonas, tendo sido identificados pelo menos quarenta isolados com estas características. O seu perfil de resistência é apresentado no Quadro XI. A divisão dos diferentes isolados de *E. coli* segundo os grupos filogenéticos conhecidos foi conseguida com base no trabalho de Clermont, Bonacorsi, & Bingen, 2000, e como referido anteriormente, os grupos foram diferenciados conforme a observação de bandas correspondentes a amplicões de três genes alvo. Os diferentes filogrupos observados para cada amostra encontram-se também referidos no Quadro XI, tendo sido verificada a seguinte frequência: filogrupo A, 47,5%, D, 25,0%, B1, 17,5%, e B2, 10,0%. É possível verificar que os isolados pertencentes ao filogrupo B2 parecem ser os que apresentam menor carga de resistência, o que pode sugerir serem estirpes mais virulentas (Escobar-Páramo, Clermont, et al., 2004). O filogrupo mais verificado neste conjunto de isolados é o A, indicando serem comensais a maioria dos isolados estudados, sendo no entanto muito inquietante a elevada carga de resistências a antimicrobianos que transportam. A frequência de resistência nos 40 isolados é factualmente elevada (Quadro X), sendo reveladora de uma elevada pressão seletiva. Os estudos de filogenia (efetuados na segunda fase do trabalho) indicam que essa pressão seletiva poderá ter ocorrido num biótopo exterior aos animais amostrados neste trabalho. A possibilidade de um determinado hospedeiro ser portador de estirpes multiresistentes sem que alguma vez tenha tomado qualquer

antimicrobiano tem sido prolificamente estudada e demonstrada, particularmente em animais silvestres que habitam regiões bastante remotas (Pinto et al., 2010; Sjölund et al., 2008).

Quadro X – Frequência de resistências observadas nos testes de suscetibilidade realizados nas quarenta *E.coli* selecionadas de entre os isolados de amostras fecais de cães selecionados aleatoriamente no Hospital Veterinário UPVET. (ver lista de abreviaturas na página xi)

Resistência a antibióticos	Nr. de isolados	% de resistências
AMP	36	90%
TE	34	85,0%
KF	34	85%
NA	34	85%
CIP	30	75%
SXT	26	65%
S	26	65%
C	23	57,5%
ATM	20	50%
CAZ	18	45%
CTX	13	32,5%
FOX	12	30%
K	12	30%
CN	10	25%
AMC	10	25%
TOB	9	22,5%
AK	1	2,5%

3.1.2. Caracterização molecular das resistências aos β -lactâmicos e às quinolonas

Embora o perfil de resistência a antimicrobianos destes quarenta isolados seja alargado a outras classes, foi decidido estudar apenas o suporte genético para as resistências anteriormente referidas, em virtude da sua relevância clínica e por serem resistências que se encontram frequentemente associadas no mesmo transposição ou plasmídeo. São também as duas classes de antibióticos mais utilizadas em infeções bacterianas. Dos isolados

selecionados, 38 classificam-se produtores de ESBL, segundo os testes microbiológicos realizados, e 34 apresentavam resistência à ciprofloxacina e/ou ácido nalidíxico. Os restantes isolados foram utilizados como controlo, pretendendo-se verificar a ausência de genes ou mutações em regiões determinantes de resistência, para estas duas classes de antibióticos. Com exceção de dois isolados (número 7 e 38), em todos os restantes produtores de ESBL, o seu fenótipo foi justificado pela presença de genes codificantes de β -lactamases. Observou-se também a presença de mais do que uma variedade de genes em cada isolado. A frequência da presença de genes *bla* neste conjunto de isolados foi de: 47% *bla*_{TEM} (18 isolados), 34% *bla*_{SHV} (13 isolados), 24% *bla*_{OXA} (9 isolados), 18% *bla*_{CTX-M-1} (7 isolados - correspondendo na totalidade ao subgrupo CTX-M-15) , 8% *bla*_{CTX-M-2} (3 isolados), 3% *bla*_{CTX-M-9} (1 isolado). Todos os outros genes referidos anteriormente foram pesquisados mas não foram encontrados. A presença da enzima CTX-M-15 em bactérias colonizadoras do trato intestinal de animais de companhia foi também já verificada noutros trabalhos (Ewers et al.,2010), facto importante e que realça uma possível transferência humano-animal, tendo em conta que esta enzima se encontra em grande expansão e sendo muito encontrada em isolados clínicos humanos, estando assim os animais também em risco de adquirirem estirpes bacterianas multirresistentes no contacto com os humanos, criando assim dois hospedeiros. Este trabalho ainda se encontra em conclusão, pelo que será importante, futuramente, proceder à sequenciação destes genes de modo a identificar a que subgrupos pertencem as enzimas em questão, assim como verificar a presença de novas mutações. Todos os isolados com fenótipo de resistência às quinolonas foram confirmados genotipicamente quer pela presença de mutações na região determinante de resistência dos genes cromossomais *gyrA* e *parC*, o que demonstra uma transferência vertical de resistência, ou, apenas em 3 isolados, pela presença de um determinante de resistência mediado por plasmídeo – gene *qnrS*, o que pode demonstrar uma transferência horizontal. Todos os outros genes referidos anteriormente foram pesquisados mas não foram encontrados. No Quadro XII observa-se que os isolados com fenótipo de resistência à ciprofloxacina e ao ácido nalidíxico, são justificados, pela presença de duas mutações na região determinante de resistência do gene cromossomal *gyrA*, e uma ou duas mutações no gene *parC*. As mutações observadas já se encontravam descritas, pelo que as mais verificadas em *gyrA* (83% - 25 isolados), foram a presença de uma leucina na posição 83 e uma asparagina na posição 87 (Leu83Asn87). No gene cromossomal *parC* as mutações são mais

diversificadas pelo que se observa em 83% dos isolados (25) a substituição por uma isoleucina na posição 80 (Ile80). Um isolado apresentava ainda, além das mutações em ambos os genes, a presença do gene *qnrS*. Quando o fenótipo apresentava apenas resistência ao ácido nalidíxico, observa-se a presença do gene *qnrS* acompanhado da ausência de mutações nos genes cromossomais, ou ainda, um genótipo com apenas uma mutação nos genes cromossomais, o que aparenta não ser suficiente para conferir resistência à ciprofloxacina. Estes resultados vão de encontro à bibliografia, onde é possível encontrar alguns estudos que reportam a presença de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBL/AmpC em isolados de animais de companhia (Dierikx et al., 2012; C Ewers et al., 2012; Schink, Kadlec, & Schwarz, 2011), assim como isolados que apresentam mutações nas regiões determinantes das resistências às quinolonas, e menos frequentemente, a presença de resistência mediada por plasmídeos (Gibson, Cobbold, Kyaw-Tanner, Heisig, & Trott, 2010). No entanto os estudos sobre a presença dessas enzimas em bactérias colonizadoras do trato intestinal de animais de companhia saudáveis continuam a ser pouco abundantes (Costa et al., 2008; Gandolfi-Decristophoris et al., 2013; Murphy et al., 2009), pelo que se torna importante avaliar a presença de ESBL em animais de companhia saudáveis e doentes, pois a sua possível transmissão terá impacto não só na saúde animal mas também na saúde humana.

Quadro XI – Diferentes isolados de *E. coli*, numerados de 1 a 40, com respetivo fenótipo de resistência, filogrupo e genes de resistência (β-lactâmicos e quinolonas) encontrados. + representa a presença do gene e – a sua ausência. Todos os outros genes listados no Capítulo II- Materiais e Métodos foram pesquisados mas não foram encontrados. Nos genes cromossomais *gyrA* e *parC* listaram-se as mutações verificadas identificando o novo aminoácido e a posição de mutação. (Leu, leucina; Asn, asparagina; Tyr, tirosina; Gly, glicina; Val, valina; Ile, isoleucina, Thr, tirosina; Arg, arginina; Lys, lisina. Ver lista de abreviaturas de antimicrobianos na página xi).

Nr	Fenótipo de resistência	Filo grupo	Genes de resistência								
			<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>qnrS</i>
1	AMP, FOX, CIP, CN, TE, CAZ, AMC, KF, S, NA, C, TOB, SXT, K	A	-	-	+	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
2	AMP,CIP,TE,CTX,ATM,KF,S,NA,SXT	B1	+	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	Leu83Asn87	Lys84	-
3	AMP, FOX,TE,CTX,ATM,CAZ,AMC,KF,NA,SXT	A	+	-	-	-	-	-	sem mutação	sem mutação	+
4	AMP,CIP,TE,KF,S,NA,C,SXT	A	+	-	-	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80Val108	-
5	AMP, FOX, CIP, CN, TE, CAZ, AMC, KF, S, NA, C, TOB, SXT, K	A	-	-	+	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
6	AMP,CIP,TE,ATM,CAZ,KF,S,NA,C,SXT	B2	+	+	-	-	-	-	Leu83Tyr87	Ile80	-
7	AMP,TE,ATM,CAZ,KF,S,C	D	-	-	-	-	-	-	Leu83	sem mutação	-
8	AMP,CIP,TE,CTX; ATM; CAZ;KF,S,NA	D	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
9	AMP, FOX, CIP, CN, TE, CAZ, AMC, KF, S, NA, C, TOB, SXT, K	A	-	-	+	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
10	AMP, FOX, CIP, CN, TE, CAZ, KF, S, NA, C, TOB, SXT, K	A	-	-	+	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
11	ATM,CIP,TE,CTX,ATM,CAZ,KF,S,NA,SXT	D	+	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
12	AMP; CIP; CN; TE; ATM; CAZ; KF; S; NA; C; TOB; SXT; K	A	-	+	+	-	-	-	Leu83Asn87	Arg80	-
13	AMP; CIP; CN; TE; ATM; CAZ; AMC; KF; S; NA; C; TOB; SXT; K	A	-	+	+	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
14	AMP; CIP; CN; TE; ATM; KF; S; NA; C; TOB; SXT; K	A	-	-	+	-	-	-	Leu83Asn87	Arg80	-

Caracterização molecular da resistência a antimicrobianos em *E. coli* produtoras de β -lactamases de espectro alargado isoladas em cães e estudo da partilha de clones bacterianos entre animais de companhia e coabitantes humanos.

15	AMP; CIP; CN; TE; CAZ; KF; S; NA; C; TOB; SXT; K	A	-	+	+	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
16	AMP; FOX; CIP; TE; ATM; CAZ; AMC; KF; S; NA; C; SXT	B1	+	+	-	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	+
17	AMP, FOX,CIP,TE,CTX,ATM,CAZ,AMC,KF,S,NA,C,SXT	A	+	+	-	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
18	AMP,FOX,CIP,TE,CTX,ATM,CAZ,AMC,KF,NA,	B1	+	-	-	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
19	AMP; CIP; CN; CTX; ATM; KF; S; NA; C; SXT; K	D	+	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	Leu83Tyr87	Ile80	-
20	AMP,FOX,TE,CTX,ATM,CAZ,AMC,KF,NA,SXT	A	+	-	-	-	-	-	sem mutação	sem mutação	+
21	AMP,CIP,TE,KF,S,NA,C,SXT,K	A	+	-	-	-	-	-	Leu83Asn87	Thr56Ile80	-
22	AMP; CIP; TE; ATM; KF; NA; C	A	-	+	-	-	-	-	Val83Gly87	Ile80	-
23	AMP;TE; CTX;ATM; KF; NA	A	-	+	-	-	-	-	Val83	Ile80	-
24	AMP; FOX; TE; AMC; KF; S; NA; C; SXT	A	+	-	-	-	-	-	Leu83	sem mutação	-
25	AMP; FOX; CIP; TE; ATM; CAZ; AMC; KF; S; NA; C; SXT	A	+	+	-	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
26	AMP,TE,CTX,ATM,KF	D	+	-	-	-	-	-	sem mutação	sem mutação	-
27	AMP,CIP,TE,KF,S,NA,C,	A	+	-	-	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
28	AMP; TE; ATM; KF; C	D	-	+	-	-	+	-	sem mutação	sem mutação	-
29	AMP; CIP; CN; CTX; ATM; CAZ; KF; NA; SXT; K	D	+	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	Leu83Tyr87	Ile80	-
30	AMP,CIP,TE,S,NA,C,SXT	B2	+	+	-	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
31	AMP,TE,ATM,KF,S,C	D	-	+	-	-	+	-	sem mutação	sem mutação	-
32	AMP; CIP; CAZ; KF; NA; C	D	-	+	-	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
33	AMP; TE; AMC; KF; S	B2	-	-	+	-	-	-	sem mutação	sem mutação	-

Caracterização molecular da resistência a antimicrobianos em *E. coli* produtoras de β -lactamases de espectro alargado isoladas em cães e estudo da partilha de clones bacterianos entre animais de companhia e coabitantes humanos.

34	AMP;CIP;TE; CTX; KF; S; NA; K	D	-	-	-	-	-	+	Leu83Tyr87	Ile80	-
35	FOX; CTX; ATM; AK; TOB	B2	-	-	-	-	+	-	sem mutação	sem mutação	-
36	AMP; CIP; TE; CTX; ATM; CAZ; KF;NA	A	-	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
37	CIP,TE,NA,SXT	B1	-	-	-	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
38	AMP,CIP,S,NA,C,SXT	B1	-	-	-	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
39	CIP,TE,S,NA,SXT,K	B1	-	-	-	-	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-
40	AMP; CIP; TE; CTX; KF;S; NA; SXT	B1	+	-	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	Leu83Asn87	Ile80	-

Quadro XII - Mutações verificadas demonstrando-se a substituição por um novo aminoácido e a posição de mutação e a sua prevalência (em % e número de isolados) no conjunto total de isolados mencionado. Todos os outros genes listados no Capítulo II- Materiais e métodos foram pesquisados mas não foram encontrados. (Leu, leucina; Asn, asparargina; Tyr, tirosina; Gly, glicina; Val, valina; Ile, isoleucina, Thr, tirosina; Arg, arginina; Lys, lisina. Ver lista de abreviaturas de antimicrobianos na página xi).

Fenótipo resistência Quinolonas	Mutações em <i>gyrA</i> (isolados/%)	Mutações em <i>parC</i> (isolados/%)	<i>qnrS</i>	Outros genes	Total isolados
CIP + NA	Leu83 Asn87 (25 / 83%)	Ile80 (25 / 83%)	1 (3%)	0	30
	Leu83 Tyr87 (4 / 13%)	Lys84 (1 / 3%)			
	Val83 Gly87 (1 / 3%)	Ile80 Val108 (1 / 3%)			
		Thr56 Ile80 (1 / 3%)			
		Arg80 (2 / 7%)			
NA	s/mutação (2 / 50%)	s/mutação (3 / 75%)	2 (50%)	0	4
	Val83 (1 / 25%)	Ile80 (1 / 25%)			
	Leu83 (1 / 25%)				

3.2. Estudos de filogenia em isolados obtidos a partir de animais de companhia, coabitantes humanos e ambiente doméstico

3.2.1. Agregado A

Este agregado foi selecionado em virtude de integrar um elemento de risco, nomeadamente uma cadela de nove anos de idade, não castrada, com acesso ao exterior, e com uma alimentação muito variável (comercial e caseira), que padecia de uma doença de pele crónica, para o tratamento da qual foi necessário administrar diversos antimicrobianos (entre os quais amoxicilina-ácido clavulânico e ciprofloxacina) desde muito jovem, e no momento da consulta ia ser medicada para o tratamento etiotrópico de uma infeção do trato urinário. Com a análise dos inquéritos verificou-se que além da cadela, o seu proprietário também apresentava historial de toma de antimicrobianos devido a uma infeção do trato urinário complicada, contraída numa hospitalização com algaliação. Do “agregado familiar” fazia também parte um neto ainda bebé e uma gata castrada de seis anos, que não saía do interior da casa e que não partilhava as taças de alimentação com a cadela. Tendo em conta que é um agregado que pode apresentar estirpes bacterianas com elevado nível de resistência, foi selecionado para o primeiro estudo da disseminação de clones bacterianos de *E. coli*. Para isso foram recolhidas e analisadas fenotipicamente, por colaboradores do nosso laboratório, e anteriormente a este trabalho, amostras do muco da cavidade oral, urina, fezes da cadela, ambos os proprietários, e gata, assim como do ambiente doméstico (chão, taças de alimentação da cadela, porta do frigorífico). Os fenótipos de resistência encontrados e respetiva distribuição pelos locais de isolamento estão resumidos no Quadro XIII.

Quadro XIII – Fenótipos de resistência antimicrobiana observados nos diferentes isolados de *E. coli* durante o estudo do agregado A. Quadro cedido pelos colaboradores do laboratório que procederam a esta parte do trabalho em questão. (ver lista de abreviaturas na página xi)

Fenótipos de resistência antibiótica	Animais de companhia				Humanos			Ambiente doméstico		
	Fezes Cadela	Urina Cadela	Boca Cadela	Fezes Gata	Fezes Dono	Fezes Dona	Fezes Bebê	Chão Marq.	Porta Frig.	Taça Cadela
AMP, AMC, ATM, KF, CAZ, CN, S, TOB, K, CIP, NA, TE, C, SXT	1									4
AMP, ATM, KF, CAZ, CN, S, TOB, K, CIP, NA, TE, C, SXT	19		5							
AMP, ATM, KF, CAZ, S, CIP, NA, TE, C		6	4					2	1	4
Nenhuma	8		6	4	3	3	2			
S, K, NA, TE				3						
AMP, ATM, KF, CAZ				4						
AMP, ATM, KF				2						
AMP, ATM, KF, CAZ, CTX, CN, S, K, TE, C, SXT					1					
AMP, ATM, KF, CAZ, CTX, S, TOB, TE, C, SXT					5					
AMP, KF, CTX, S, K, TE, C, SXT					1					
KF, K, CIP, NA, TE, C, SXT					11					
K, CIP, NA, TE, C, SXT						6				
AMP, CN, TOB, CIP, NA						1				
AMP, S, TE, SXT						2				
S, CIP, TE, SXT						1				
TE						1				
AMP, ATM, KF, S, K, TE							1			
AMP, S, K, TE, SXT							3			
AMP, S, K, TE							3			
AMP, S, NA, SXT							1			
TE, SXT							1			
AMP, AMC, ATM, KF, CN, S, TOB, K, AK, TE, CIP, NA, C, SXT										1
AMP, ATM, KF, CN, S, TOB, K, CIP, NA, C, SXT										1
AMP, AMC, ATM, KF, CAZ, S, CIP, NA, TE, C								2	1	

É possível observar que foram isoladas estirpes com elevado número de resistências, sendo que alguns dos fenótipos similares se encontram presentes em diferentes locais, desde as fezes da cadela, à sua boca, e em locais do ambiente doméstico como no chão, na porta do frigorífico e taça de alimentação da cadela. Assim, para este trabalho, com base nesta aparente semelhança, selecionaram-se alguns desses isolados para estudos de tipagem genética, com o objetivo de inferir sobre a proximidade clonal dessas amostras. Inicialmente procedeu-se a uma tipagem genética por ERIC PCR de alguns isolados representativos de cada local e com semelhantes fenótipos de resistência, de modo a verificar geneticamente quais os isolados que poderiam apresentar semelhanças entre si. Foram também determinados os filogrupos de todas as amostras. Para facilitar a análise dos perfis genotípicos e observação de similaridades, procedeu-se à utilização do *software* FPQuest (Bio-Rad, ESTSP, Porto) apresentando na Figura 10 o dendrograma resultante e os respetivos filogrupos.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

ERIC AGREGADO A

ERIC AGREGADO A

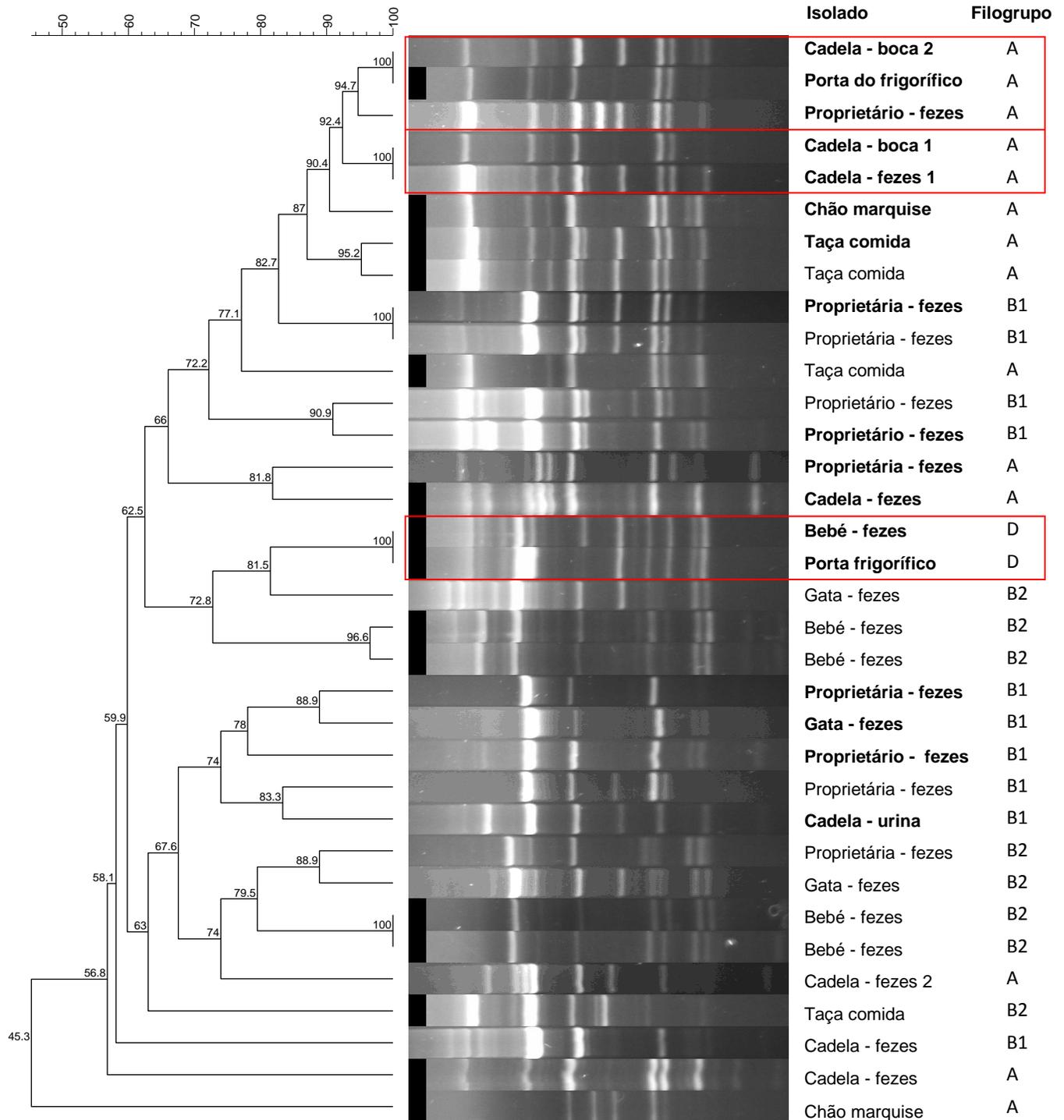


Figura 10 - Padrão de bandas visualizados na corrida de electroforese dos produtos amplificados por ERIC PCR, dos isolados selecionados para estudo do agregado A e respetivo filogrupo. Dendrograma obtido com base no agrupamento UPGMA e análise de similaridade com cálculo do coeficiente de Dice. A vermelho estão realçados alguns conjuntos de isolados com similaridades superiores a 94% e com relevância para a continuação do estudo. A negro estão realçados os isolados que foram selecionados para prosseguir o estudo com genotipagem por PFGE.

Com o padrão de bandas obtidas por ERIC PCR, verifica-se uma grande variabilidade genética entre os isolados. Ainda assim, pode-se confirmar a proximidade clonal entre alguns dos isolados obtidos de locais diferentes. Como referido no Capítulo I- Introdução, esta técnica apresenta algumas debilidades, nomeadamente porque as reações de PCR não foram todas realizadas na mesma altura, com uma mesma *master mix*, e especialmente quando os produtos não são todos submetidos à mesma corrida de electroforese, observando-se diferenças na intensidade de algumas bandas e na sua localização, quando comparando com outros géis. No entanto, nem sempre foi possível otimizar essas condições pelo que o ERIC-PCR serviu como complemento a outra técnica de tipagem mais robusta e precisa que é o PFGE. Sendo também uma técnica mais dispendiosa foram apenas selecionadas algumas amostras que: i) apresentassem fenótipos similares, ii) perfis eletroforéticos semelhantes e iii) que pela análise do ERIC PCR, apresentassem uma percentagem de similaridade próxima, assim como iv) pertencentes a iguais filogrupos e ainda v) isolados que representassem diferentes locais de recolha (Figura 11).

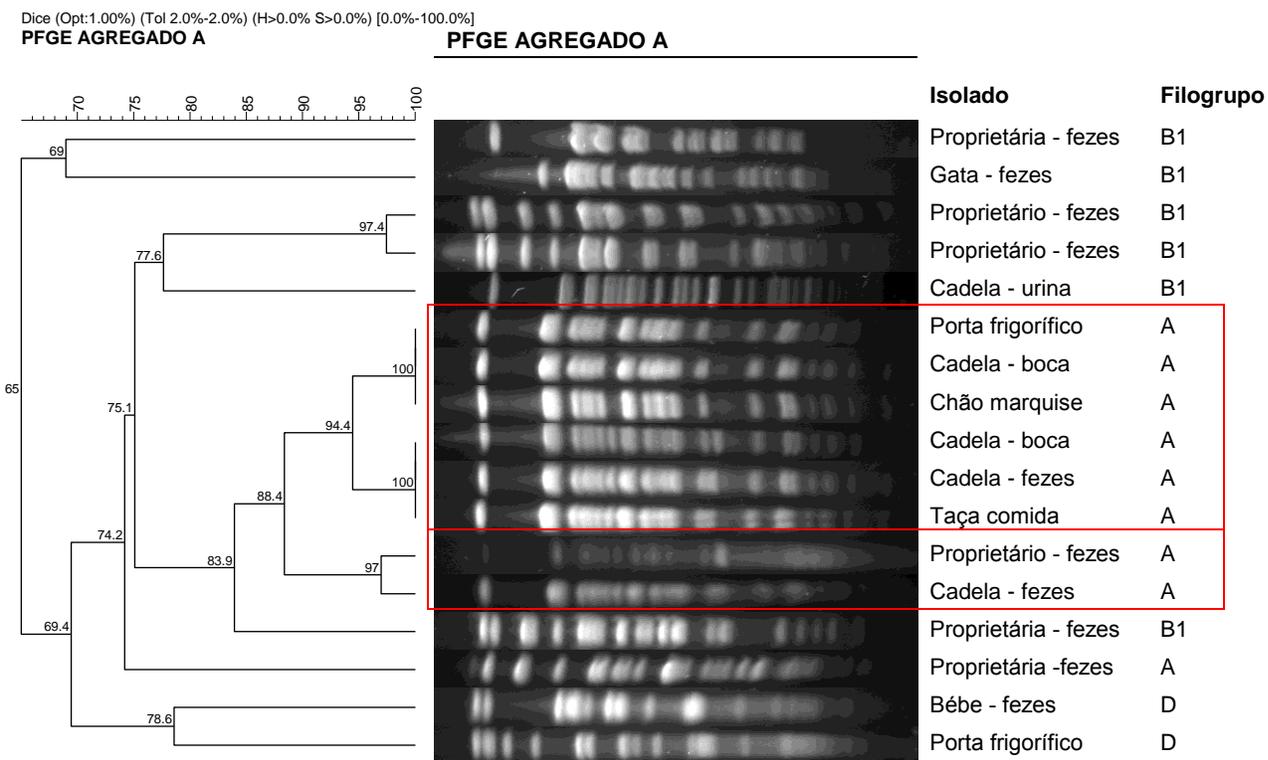


Figura 11 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese em campo pulsado com os isolados selecionados para o estudo do agregado A e respetivo filogrupo. Dendrograma obtido com base no agrupamento UPGMA e análise de similaridade com cálculo do coeficiente de Dice. A vermelho estão realçados alguns conjuntos de isolados com similaridades superiores a 94%.

Tal como esperado pelo trabalho realizado anteriormente, onde os isolados foram caracterizados fenotipicamente, pela observação da similaridade dos fenótipos de resistência e comprovado neste estudo através da tipagem genética por PFGE, existe uma disseminação de clones entre as fezes da cadela e a sua boca, facto previsível, atendendo ao habito de lamber a região peri-genital e/ou coprofagia praticadas por muitos animais de companhia. Verifica-se também uma igualdade de 100% entre uma estirpe presente na boca da cadela e diferentes locais do ambiente doméstico, chão, taça de comida, e ainda porta do frigorífico, comprovando a disseminação de estirpes com alargadas resistências da boca e fezes da cadela para o ambiente doméstico (mais de 94% similaridade). As estirpes com maior disseminação para o ambiente doméstico são maioritariamente pertencentes ao filogrupos A, tal como descrito na bibliografia, onde se verifica que o grupo A e B1 são encontrados mais facilmente no ambiente (Gordon & Cowling, 2003). A análise do dendrograma resultante do processamento informático do padrão de bandas obtido por PFGE permitiu detetar também a existência de proximidade clonal entre um isolado fecal do proprietário e um isolado fecal da cadela, pelo que se verifica a partilha de um clone de *E.coli* multirresistente entre ambos os coabitantes, que curiosamente foram os membros do agregado que mais terapias antimicrobianas realizaram. No entanto, não se pode definir qual o sentido da transferência bacteriana, visto que pode ocorrer em ambos os sentidos. Perante estes dados, o supracitado isolado das fezes do proprietário parece também ele um clone do “isolado dominante” (88,4% similaridade), que, no entanto, se encontrou principalmente disseminado em superfícies domésticas e a colonizar o animal que mais terapias antimicrobianas realizou (cadela). Na análise do ERIC-PCR verificou-se também proximidade clonal entre um isolado encontrado na porta do frigorífico e um das fezes do bebé, que no entanto, a sua análise por PFGE revelou uma proximidade clonal muito afastada (78,6%). As bactérias isoladas de fezes apresentam-se divididas entre dois filogrupos, B2 e B1, estando o grupo B2 presente nas fezes do bebé. Nowrouzian, Wold, & Adlerberth, 2005 observaram que *E.coli* pertencentes ao grupo filogenético B2, estão mais envolvidas em infeções extraintestinais, apresentando capacidade superior de persistir na microflora intestinal das crianças, independentemente dos genes de virulência transportados.

Nas fezes da gata foi verificado um número baixo de resistências, registando-se que este animal não fez terapias antimicrobianas. Assim, tem cabimento supor que este terá

adquirido as poucas resistências que apresenta nos seus isolados por contacto com os membros do agregado, ou com o microbismo da casa. Verificando-se através do ERIC PCR e PFGE que as estirpes isoladas deste animal não são coincidentes com as encontradas nos outros membros, pode-se por em hipótese que essas estirpes não colonizaram no animal, no entanto transferiram alguns dos seus genes de resistência através de elementos genéticos móveis presentes por exemplo em plasmídeos. No entanto, o facto de não apresentar fenótipos com elevado número de resistências pode ser pelo facto de a gata não se alimentar pela taça da cadela, na qual foi verificado alguns isolados com o maior número de resistências, derivados da boca e fezes da cadela. Outras fontes ambientais, como a água de abeberamento, ou a alimentação não devem ser excluídas.

Aquando da realização deste trabalho foram verificadas algumas dificuldades. Alguns isolados de *E. coli* selecionados apresentavam-se como não tipáveis pela técnica de PFGE, sofrendo degradação do DNA como pode ser observado na Figura 12. Após pesquisa bibliográfica foi compreendido que este acontecimento parece ser devido à presença de um elevado número de endonucleases que digerem a amostra e que mantem uma atividade mesmo após as lavagens com presença de proteinase K. Foi também observado por Ray, Mills, & Dyson, 1995, que compostos derivados do Tris se formam no ânodo durante a electroforese contribuindo também para este problema. Após pesquisa bibliográfica e realização de alguns testes verificou-se que isto poderia ser neutralizado pela adição de tiourea, em concentrações entre 50 μ M (Stubbs et al., 2000) e 200 μ M (Fawley & Wilcox, 2002), tanto no *buffer* quanto no gel, assim como a utilização de maior concentração de proteinase K em solução, pois elevadas concentrações de proteinase K podem ajudar na digestão de endonucleases mais facilmente. O protocolo utilizado foi assim otimizado passando-se a utilizar uma concentração de proteinase K de 2 mg/mL e ainda, adição de 100 μ M de tiourea (AppliChem) a cada litro de TBE, e no gel, pois verifica-se contribuir como recrutador de radicais Tris responsáveis por parte do problema.

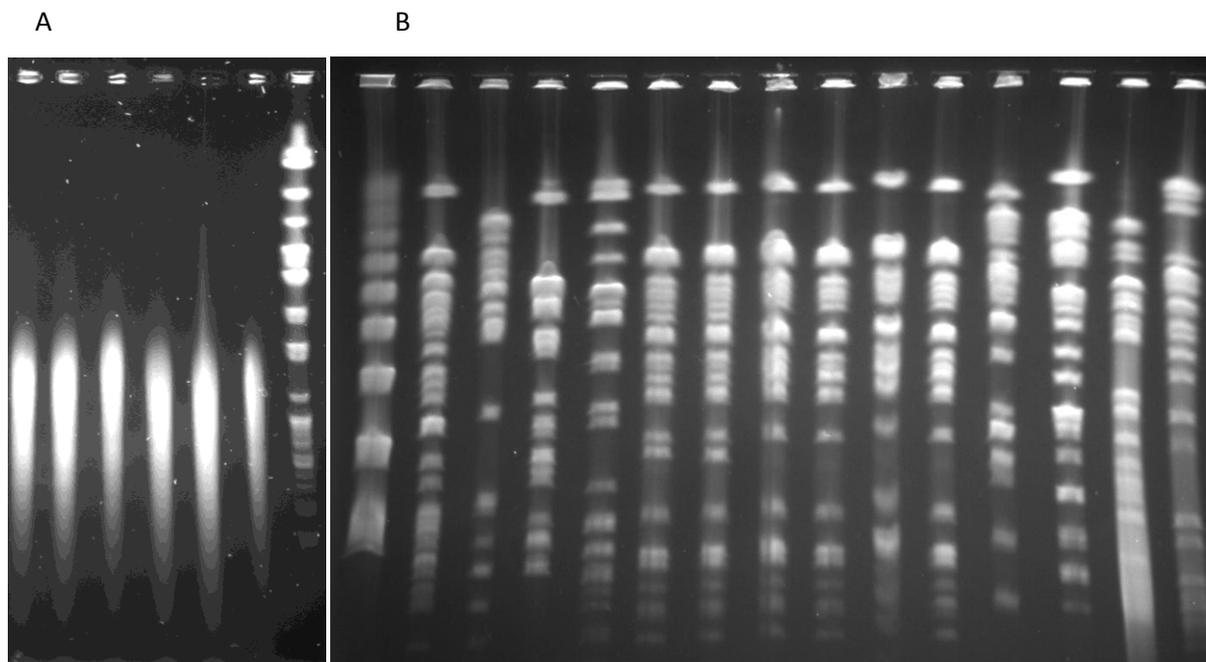


Figura 12 – Imagem obtida por PFGE que demonstra isolados que inicialmente se apresentavam como incapazes de serem tipáveis por PFGE (A), e posteriormente, com mudança do protocolo, observação de bandas resultantes da digestão do DNA e corrida em campo pulsado (B).

3.2.2. Agregado B

Deste agregado fazia parte uma cadela de raça S. Bernardo, com 11 anos de idade que consultou o Hospital Veterinário do ICBAS por apresentar infeções do trato urinário recorrentes. Foi realizada uma ecografia na qual se observou uma massa heteroecogénica no lúmen da bexiga, que se veio a confirmar ser um tumor, provavelmente responsável pelas infeções urinárias recidivantes que a conduziram a vários tratamentos com antibióticos. Desta cadela foram isoladas amostras de *E. coli*, provenientes das fezes, boca e pelo/pele. Testes de suscetibilidade antimicrobiana já tinham sido feitos pelo que se verificou a igualdade do fenótipo multirresistente entre três isolados (AMP CIP CN CTX ATM CAZ KF S NA C SXT K). Neste trabalho procedeu-se ao seu estudo molecular por tipagem por ERIC PCR e PFGE e construção do respetivo dendrograma (Figura 13). Determinou-se também o filogrupos dos três isolados, que corresponderam ao grupo D.

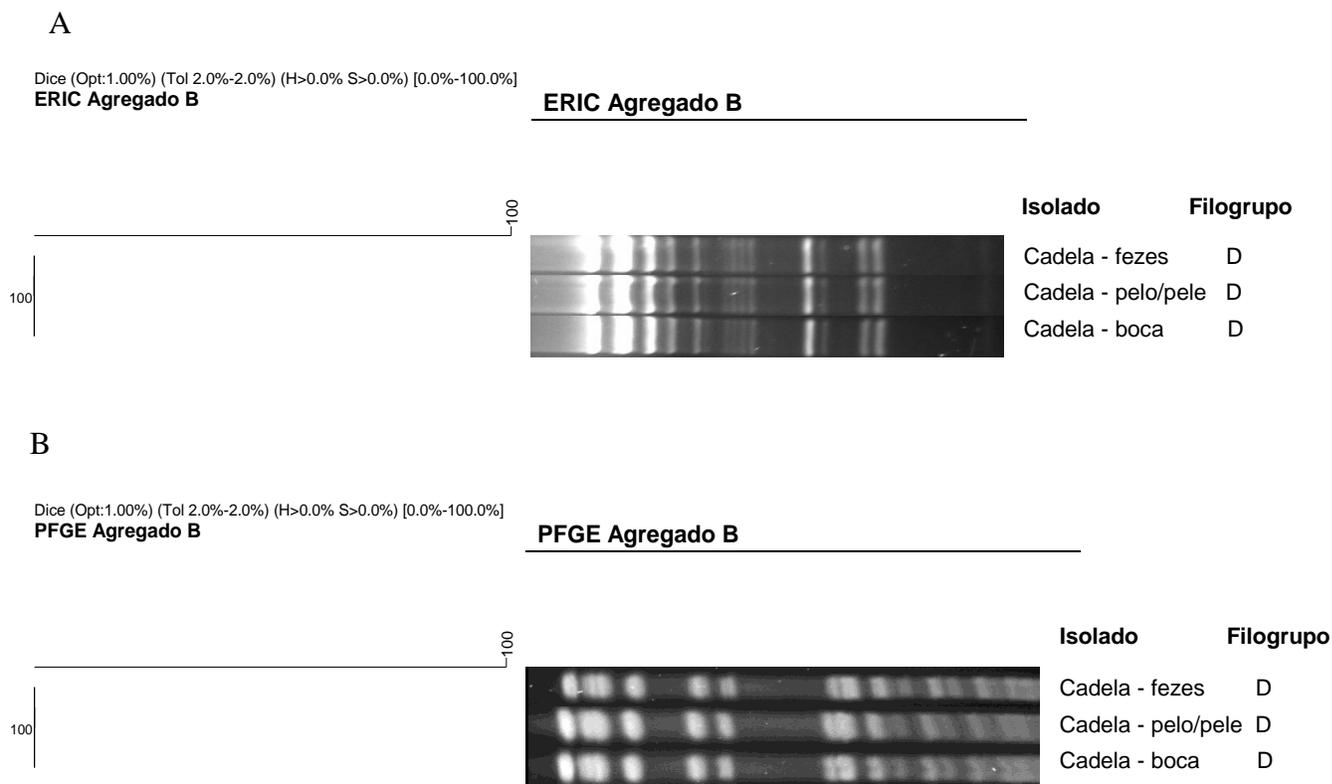


Figura 13 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese dos produtos da reação de ERIC PCR (A) e bandas resultantes da digestão do DNA bacteriano com a enzima XbaI com corrida em electroforese em campo pulsado(B), dos isolados estudados no agregado B, e respetivo filogrupo. Dendrograma e percentagens de similaridade obtidos com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice.

Os resultados demonstram a presença de um mesmo clone bacteriano em três locais do animal. Sendo um animal que pratica coprofagia, podemos deduzir que a direção da disseminação deste clone bacteriano terá sido das fezes para a boca e depois, possivelmente, para o pelo e pele, através de lambidelas. Observa-se que esta estirpe subsiste assim noutros locais do corpo do animal além do trato intestinal, estando mais acessível para aquisição por outros membros do agregado, quer por festas e/ou lambidelas, ou durante a prestação de cuidados de maneo e higiene ao animal.

3.2.3. Agregado C

Deste agregado faz parte um gato, não castrado, com 4 anos de idade e que frequenta apenas o interior da casa e uma varanda, e que foi selecionado por ter feito várias terapias com antibióticos (ciprofloxacina, penicilina e gentamicina) devido a padecer de infeções urinárias recorrentes. Este animal alimentava-se de uma mistura de ração comercial e em pequena quantidade de comida preparada pelos proprietários. O seu agregado não tinha nenhuma história de terapia relevante. A proprietária e respetiva filha eram os membros do agregado que mais tempo dedicavam em atenção e cuidados ao animal.

Foram anteriormente recolhidas amostras das fezes da proprietária e filha e do respetivo gato, além doutros isolados bacterianos. Verificou-se, através da similaridade do fenótipo de resistência (QD TE RD E AZM CIP), a presença de *Enterococcus* spp. que poderiam ser derivados de um mesmo clone. Para aprofundar esse estudo determinou-se a espécie por multiplex PCR, sendo que todos pertenciam à espécie *E. faecalis* (Figura 14). Após verificar a igualdade procedeu-se à tipagem genética por ERIC-PCR e análise do respetivo dendrograma (Figura 15). A técnica de PFGE para gram positivos é um pouco mais complicada, pois a extração de DNA é mais difícil devido à elevada camada de peptidoglicano, e estando ainda a solução bacteriana suspensa nos plugs de agarose, é dificultada ainda mais a extração do DNA. Assim o protocolo utilizado normalmente para *E. coli*, com a respetiva enzima *Sma*I para *Enterococcus*, não resultou, pelo que até à entrega desta dissertação não houve hipótese de otimização e implementação deste protocolo no laboratório.

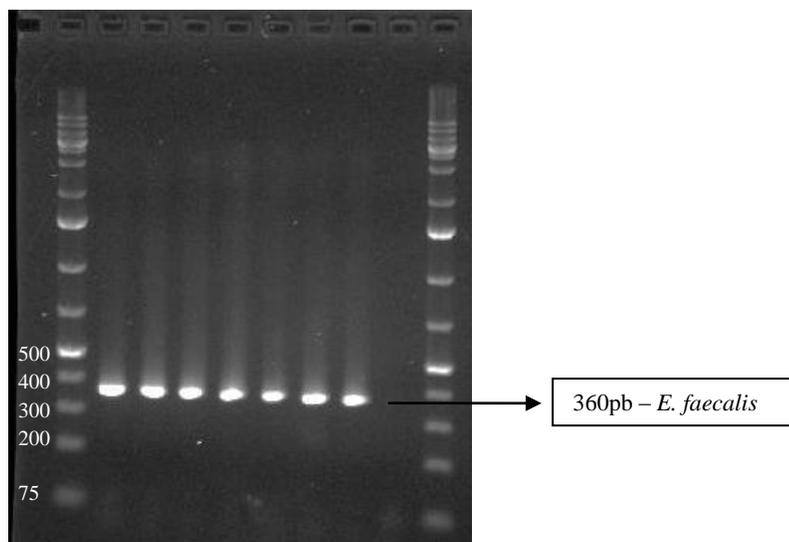


Figura 14 – Imagem obtida neste trabalho e demonstrativa da amplificação resultante do PCR para identificação de espécie de *Enterococcus*. Observa-se em todas as amostras uma banda de 360pb que corresponde à espécie *E. faecalis*.

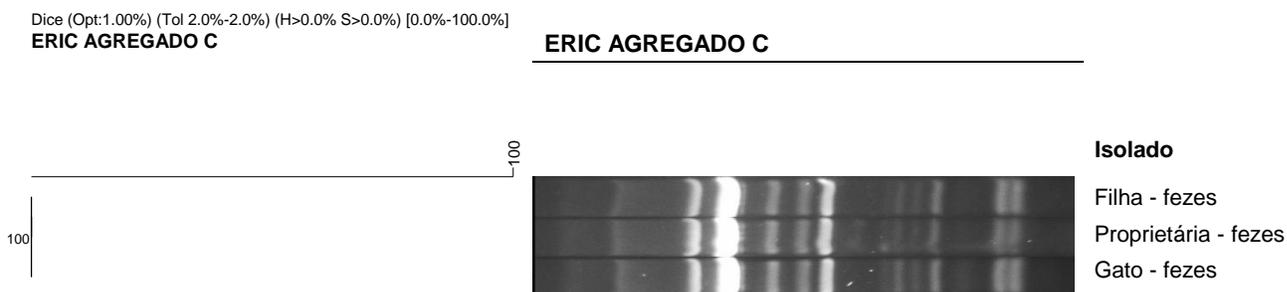


Figura 15 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese dos produtos da reação de ERIC PCR, dos isolados do agregado C. Dendrograma e percentagens de similaridade obtidos com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice

No entanto, nesta situação o ERIC-PCR foi suficiente para permitir observar que as três amostras apresentam um padrão de amplificação por ERIC PCR, semelhante, pelo que se comprova a partilha deste clone de *Enterococcus faecalis* nas fezes dos três membros do agregado. Tendo em conta que o animal foi sujeito a varias antibioterapias, inclusivamente

com ciprofloxacina, e observando-se entre outras, resistência a esse antibiótico, podemos por em hipótese que o sentido da transferência dessa estirpe bacteriana possa ter ocorrido do animal para os proprietários.

4.2.2. Agregado D

Este agregado é constituído por um cão, de sete anos de idade, que apresentava um problema cutâneo severo (piodermite fistulosa profunda), tendo sido submetido a tratamentos prolongados com antimicrobianos (amoxicilina-ácido clavulânico, cefadroxilo, enrofloxacina, metronidazol, clindamicina). Este animal além do apartamento onde vivia, frequentava, solto, ambientes rurais. Alimentava-se de ração comercial e alimentos preparados pelos proprietários, ou crus. Os seus proprietários não apresentavam qualquer história clínica relevante. Deste agregado foram anteriormente recolhidos amostras bacterianas das mãos e fezes dos proprietários e das fezes e boca do cão. Verificou-se a igualdade dos fenótipos de resistência (AMP QD TE RD E CN AZM C) em alguns isolados das fezes e boca do cão, e das mãos da proprietária e sua filha. Assim, para esta parte do trabalho avançou-se com a caracterização da espécie, desses isolados que apresentavam características fenotípicas iguais, verificando que eram todos *E. faecalis*. Realizou-se posteriormente a sua tipagem por ERIC-PCR (Figura 16).

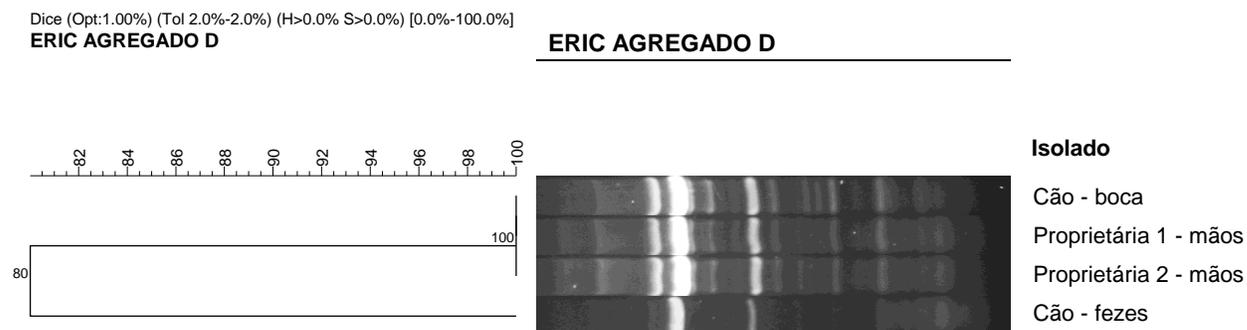


Figura 16 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese dos produtos da reação de ERIC PCR dos isolados estudados no agregado D. Dendrograma e percentagens de similaridade obtidos com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice

Analisando o dendrograma construído com base na imagem do gel de electroforese da corrida dos produtos de amplificação do ERIC PCR, observamos que os isolados da boca do cão e mãos das proprietárias são iguais, estando assim implícita uma partilha de um clone de *Enterococcus faecalis* que pode ter tanto como origem as mãos das proprietárias como a boca da cadela. O isolado fecal apresenta grande divergência dos outros isolados, no entanto por observação do gel deve-se a um má amplificação das sequências por ERIC PCR, sendo que as cinco bandas em falta (verificadas pelo dendrograma, não apresentado, construído com base na diferença de bandas) estão presentes de uma forma muito ténue, quase não reconhecível, pelo que não foram assinaladas aquando da análise do gel no programa FPQuest. No entanto é possível inferir, que os quatro isolados serão muito provavelmente clones de uma mesma estirpe e estando presentes na proprietária e sua filha, pois eram quem estava em mais contacto com o animal. A não presença desta estirpe multirresistente nas fezes das proprietárias pode dever-se a cuidados de higiene praticados. No entanto, pelo facto de estarem presentes nas mãos podem facilmente ser transferidas para a mucosa oral, apresentando um risco preocupante.

4.2.2. Agregado E

Este agregado foi selecionado com base num dos membros, um cão (cão A) que apresenta otites alérgicas e que foi consultado por apresentar uma otite recidivante e purulenta. Este animal tinha efetuado até ao momento da recolha, vários tratamentos com antimicrobianos. Do mesmo agregado faziam parte outro cão (referido ao longo do trabalho como cão B) e uma cadela. Deste agregado foram feitas zaragatoas para recolha de amostras bacterianas de fezes, mucosa oral, pele/pelo, e de alguns dos constituintes do ambiente domestico (brinquedos, cobertores, trelas, coleiras, camas dos cães, puxadores, comandos de TV), e ainda das fezes dos proprietários. Anteriormente foi feita a caracterização do fenótipo de resistência destes isolados bacterianos recolhidos (*E. coli* e *Enterococcus* spp.), pelo que se verificaram diferentes fenótipos em que alguns se repetiam em isolados recolhidos de origens diferentes. Perante esta distribuição selecionou-se o fenótipo aparentemente mais disseminado entre as estirpes de *E.coli* isoladas em diferentes locais, procedendo-se ao estudo genético de alguns isolados desse conjunto. Do mesmo modo foram selecionados quatro fenótipos dominantes de entre os isolados de enterococos possivelmente disseminados dentro do agregado.

Para este trabalho foram selecionados os isolados de *E. coli* cujos fenótipos de resistência apresentam apenas pequenas variações e se encontram-se descritos no quadro XIV, e que pela sua igualdade demonstram a possibilidade de disseminação entre diferentes membros e locais do habitat. Foi determinado primeiramente o filogruppo de todos os isolados de *E. coli* (Figura 17), onde se verificou serem todos pertencentes ao grupo A, excetuando o isolado das fezes da proprietária que é pertencente ao grupo B2, e que já fenotipicamente se demonstrou diferente dos restantes isolados, no entanto foi incluído para estarem representados todos os locais de recolha.

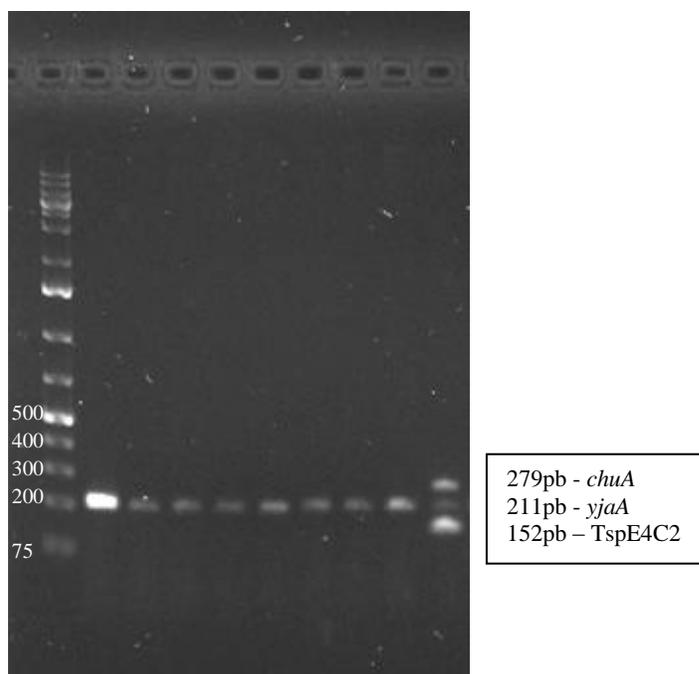


Figura 17 - Imagem obtida neste trabalho correspondente à corrida de electroforese do produto do multiplex PCR para determinação dos grupos filogenéticos de algumas estripes de *E.coli* do estudo do agregado E, Verifica-se a amplificação constante de uma banda de 211pb correspondente ao gene *yjaA*, demonstrando a igualdade dos filogrupos (A), excetuando a ultima amostra correspondente às fezes da proprietária, onde se verifica a presença de três bandas correspondendo ao filogrupos B2.

Quadro XIV - Fenótipos de resistência similares verificados em vários isolados de *E.coli* com origens diferentes, destacando-se o isolado bacteriano da proprietária que apresenta apenas duas resistências. (ver lista de abreviaturas na página xi)

Isolados	Fenótipos de resistência
Cão A	AMP, FOX, CIP, CN, TE, CAZ, AMC, KF, S, NA, C, TOB, SXT, K
Cão B	AMP, FOX, CIP, CN, CAZ, AMC, KF, S, NA, C, TOB, SXT, K
Cadela	AMP, FOX, CIP, CN, TE, CAZ, KF, S, NA, C, TOB, SXT, K
Proprietário	AMP, FOX, IPM, CIP, CN, TE, CAZ, AMC, KF, S, NA, C, TOB, SXT, K
Ambientais	AMP, FOX, CIP, CN, TE, CTX, CAZ, AMC, KF, S, NA, C, TOB, SXT, K
	AMP, FOX, CIP, CN, CAZ, AMC, KF, AK, S, NA, C, TOB, SXT, K
Proprietária	AMP, S

Posteriormente efetuou-se a tipagem genética por ERIC PCR e PFGE, em dois géis diferentes pois o molde para a electroforese em campo pulsado apenas apresenta 15 poços. Com uma análise a “olho nu” é clara a semelhança ou até igualdade entre a maioria dos isolados, no entanto, foi efetuada a análise dos dois géis com o software e construído o dendrograma, clarificando a percentagem de similaridade entre as diversas amostras com origens diferentes (Figura 18).

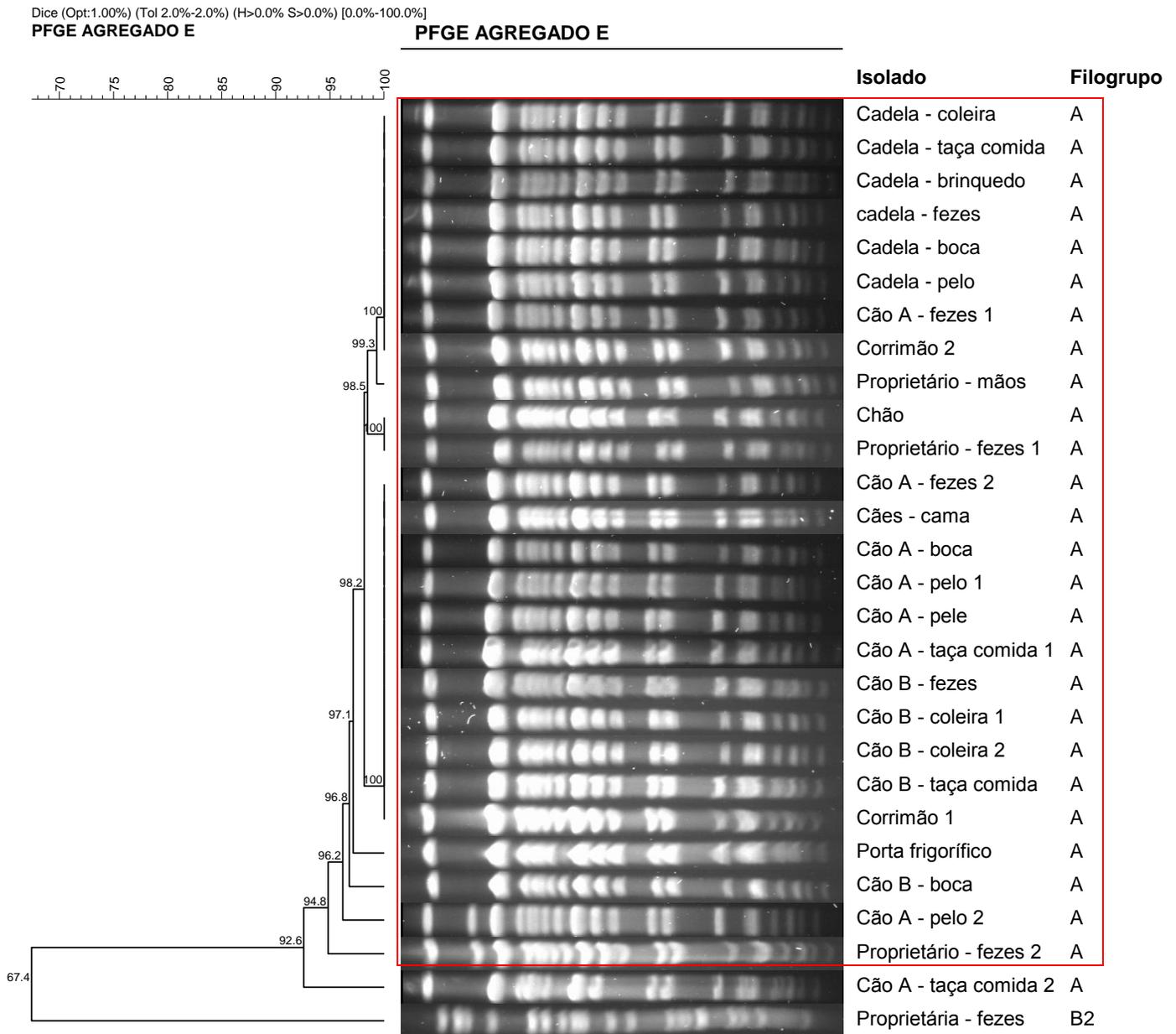


Figura 18 - Perfil genético obtido na corrida de electroforese em campo pulsado, dos isolados pertencentes ao agregado E e respetivo filogrupo. Dendrograma e percentagens de similaridade obtidos com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice. A vermelho está realçado o conjunto de isolados com similaridades superiores a 94%.

Com a análise dos dendrogramas podemos concluir que todos os isolados com fenótipo de resistência similar, amostrados quer das fezes do cão A, quer cadela e cão B pertencente ao agregado, assim como de diferentes locais do ambiente doméstico apresentavam uma proximidade clonal entre 94,8% e 100% , pelo que podemos inferir sobre a existência da transferência e disseminação de um clone de *E. coli*. As diferenças verificadas nos fenótipos de resistências, que consistem na falta ou presença de resistência a um ou dois antibióticos, pode ser justificada pela perda de plasmídeos ou aquisição de novos, aquando do contacto dessas bactérias com outras, quer no meio ambiente, quer no organismo. Os isolados das fezes dos proprietários são os mais distantes a nível de proximidade clonal, tendo-se isolado na proprietária uma estirpe completamente diferente dos outros isolados (68,9%), como já era previsível pela análise do seu fenótipo de resistência. Não tendo sido isolada nenhuma estirpe com fenótipo equivalente ao da estirpe recolhida nos outros hospedeiros, permite-nos pressupor que este elemento do agregado não adquiriu o clone bacteriano de *E. coli* em questão. Relativamente ao proprietário, ainda se pode considerar que este também partilha do mesmo clone verificado nos outros locais.

Para se avaliar a eficiência do ERIC PCR os mesmos isolados foram amplificados por esta técnica (Figura 19). Apesar de se verificar uma semelhança de 94% a 100% entre vários conjuntos de isolados, entre a totalidade apenas se verifica uma igualdade de 81,2% em vez dos 92,6% que se verifica no PFGE. Observando o gel a “olho nu” verifica-se a igualdade entre as amostras, no entanto, como já foi referido, devido às reações terem sido feitas em alturas diferentes e corridas em dois géis de electroforese separados, são variantes que provocam diferenças que são consideradas como divergências entre os isolados, pelo *software* de análise dos padrões de bandas.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

ERIC AGREGADO E (E.COLI)

ERIC AGREGADO E (E.COLI)

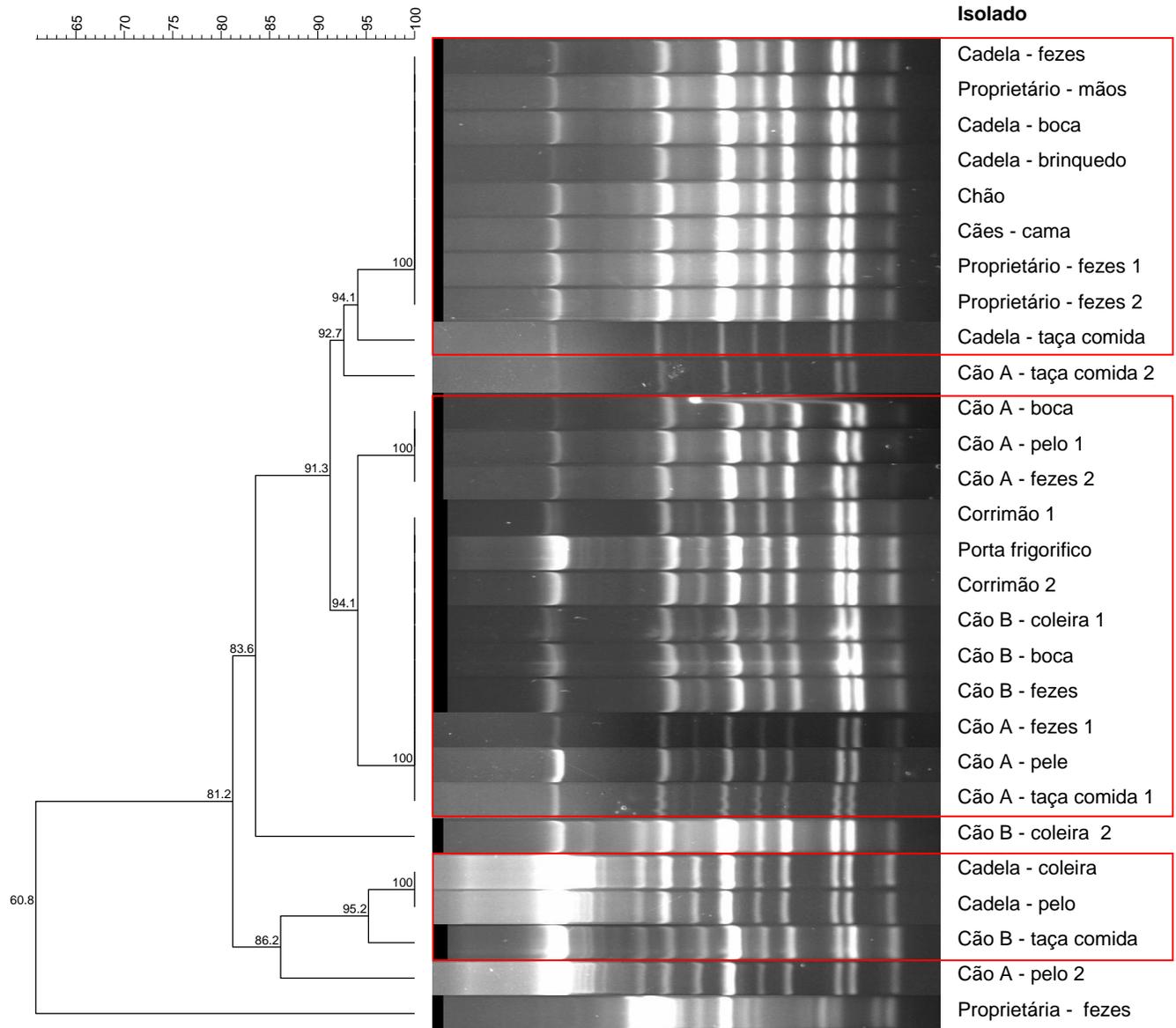


Figura 19 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese dos produtos da reação de ERIC PCR. Dendrograma e percentagens de similaridade obtidos com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice. A vermelho estão realçados alguns conjuntos de isolados com similaridades superiores a 94%.

Para a análise de quatro conjuntos de isolados de *Enterococcus* organizados com base em quatro fenótipos de resistências que foram verificados (Quadro XV) em diferentes locais, procedeu-se inicialmente à caracterização da espécie. Foram verificados que todos os isolados eram pertencentes à espécie *E. faecalis*. Procedeu-se de seguida à tipagem por ERIC PCR tendo-se obtido os seguintes padrões de bandas (Figura 20).

Quadro XV – Distinção de quatro fenótipos de resistência. Cada fenótipo corresponde a um grupo de isolados de *Enterococcus* com variadas origens dentro do agregado E. (ver lista de abreviaturas na página xi)

Isolados	Fenótipos de resistência
1º fenotipo	AZM, CN, CIP, E, QD, RD ,TE
2º fenotipo	AZM, E, RD,TE
3º fenotipo	AZM, E, QD, RD, TE
4º fenótipo	QD, RD, TE,

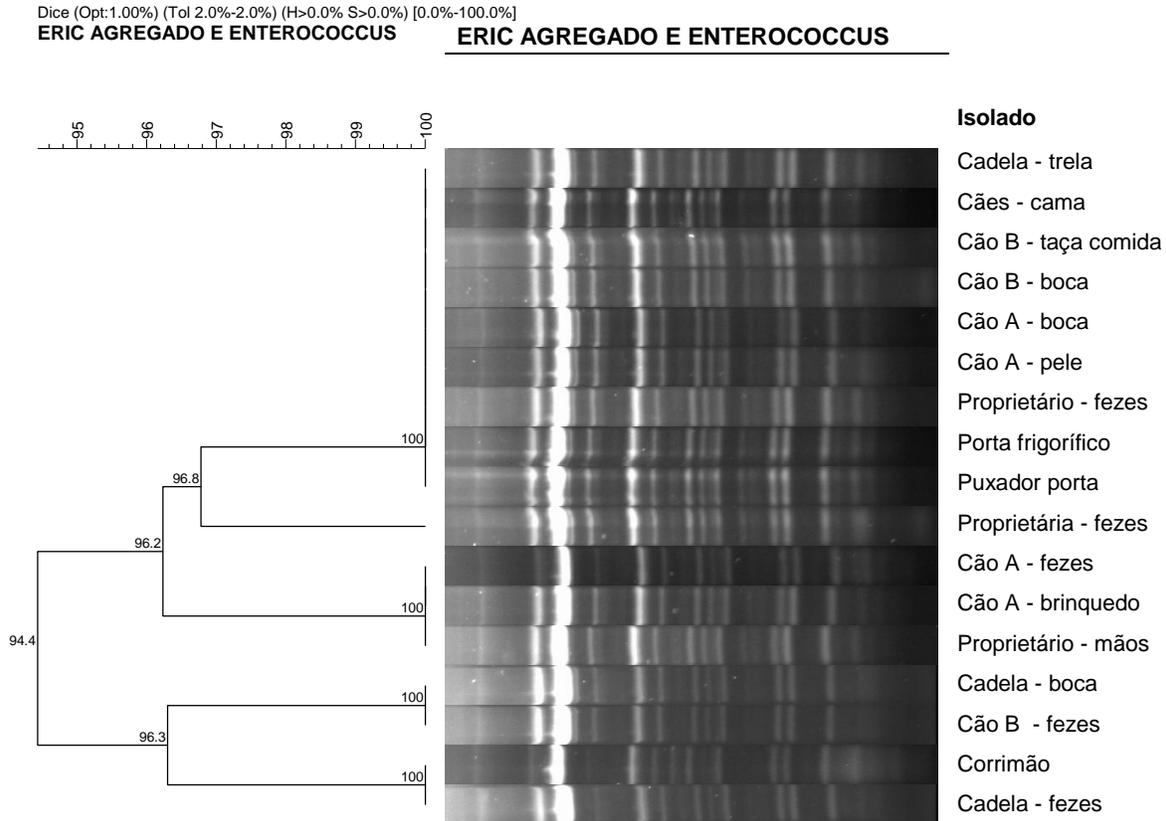


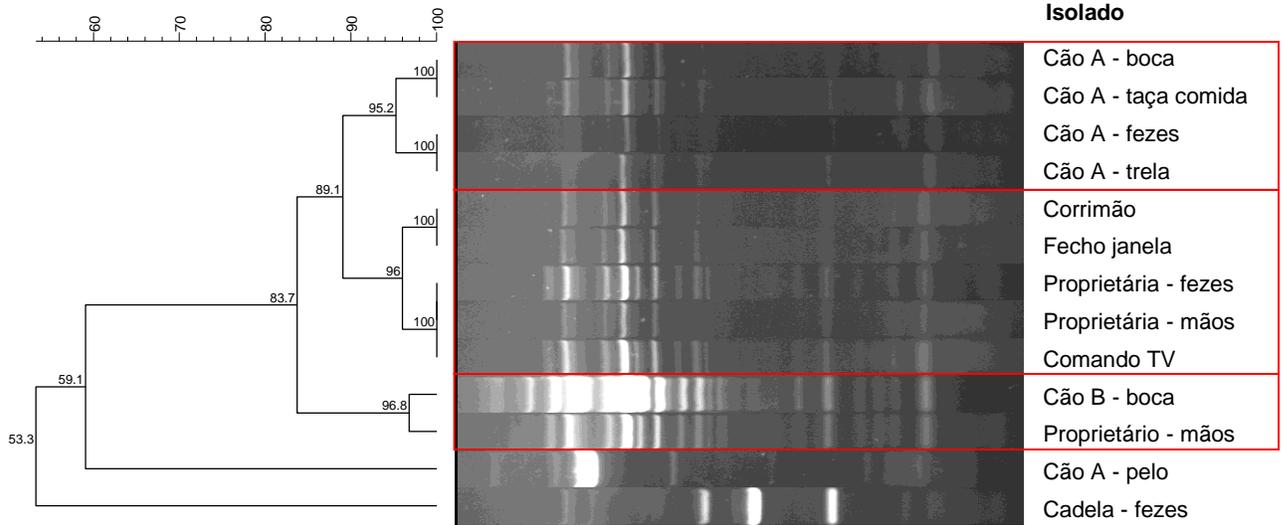
Figura 20 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese dos produtos da reação de ERIC PCR do conjunto de isolados que apresentam o primeiro fenótipo. Dendrograma e percentagens de similaridade obtidos com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice.

Da análise deste primeiro conjunto de isolados podemos verificar que apresentam um padrão de bandas muito semelhante, apresentando todos uma proximidade clonal (94,4% de similaridade), verificando-se assim, a partilha deste clone entre os diferentes membros do agregado e diversos locais do ambiente doméstico. Embora não se podendo concluir nada sobre a origem deste clone bacteriano pode-se inferir que possivelmente terá sido disseminado das fezes do cão, que foi o membro que a mais terapias antimicrobianas foi sujeito, justificando o fenótipo de resistências deste clone.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

ERIC AGREGADO E ENTEROCOCCUS

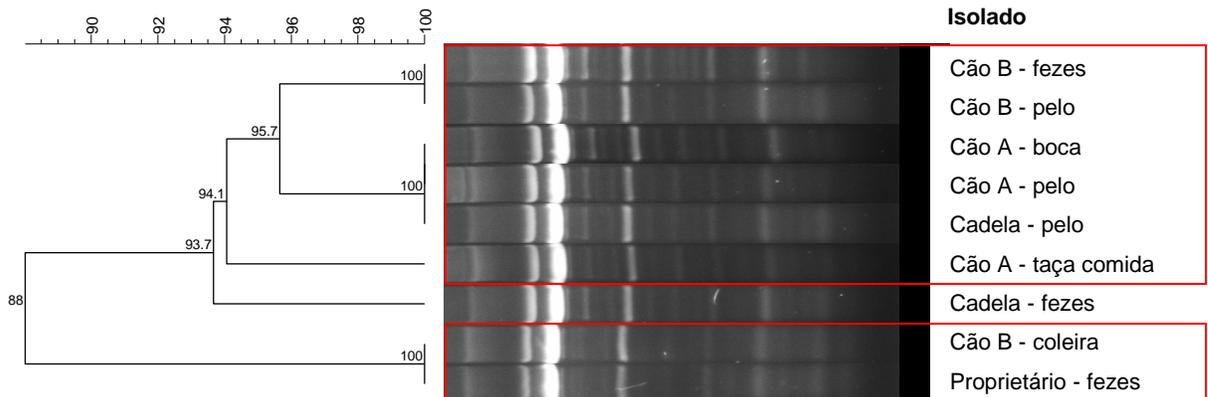
ERIC AGREGADO E ENTEROCOCCUS



Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

ERIC AGREGADO E ENTEROCOCCUS

ERIC AGREGADO E ENTEROCOCCUS



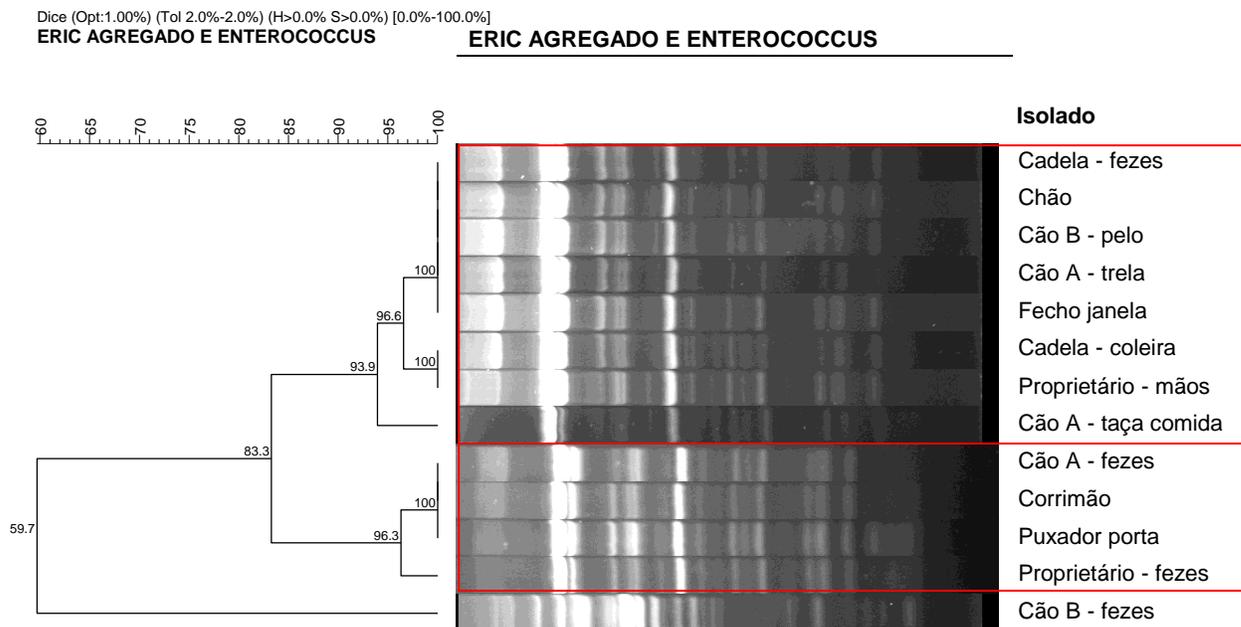


Figura 21 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese dos produtos da reação conjuntos de isolados de *Enterococcus* pertencentes ao 2º,3º e 4º fenótipos. Dendrograma e percentagens de similaridade obtidos com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice.

Embora com menor prevalência do que o 1º fenótipo, a análise dos dendrogramas dos restantes isolados (Figura 21) demonstram que existe igualmente uma disseminação entre diferentes membros e espaços do habitat. Ao contrário do verificado com as estirpes de *E.coli*, verificou-se uma partilha de clones bacterianos de *Enterococcus faecalis* (fenótipo um e dois) entre as fezes dos animais do agregado e a sua proprietária. Tendo esta proprietária menos contacto com o animal, e não podendo por de parte outros meios de transferência bacteriana (cadeia alimentar, contacto sexual, entre outros), e considerando que os enterococos apresentam grande capacidade de sobrevivência no meio ambiente (Fisher & Phillips, 2009), é uma possibilidade a aquisição destas estirpes por contacto com superfícies do ambiente doméstico, uma vez que foram encontradas em várias superfícies e objetos de sua casa.

Caracterização molecular da resistência a antimicrobianos em *E. coli* produtoras de β -lactamases de espectro alargado isoladas em cães e estudo da partilha de clones bacterianos entre animais de companhia e coabitantes humanos.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
ERIC AGREGADO E ENTEROCOCCUS

ERIC AGREGADO E ENTEROCOCCUS

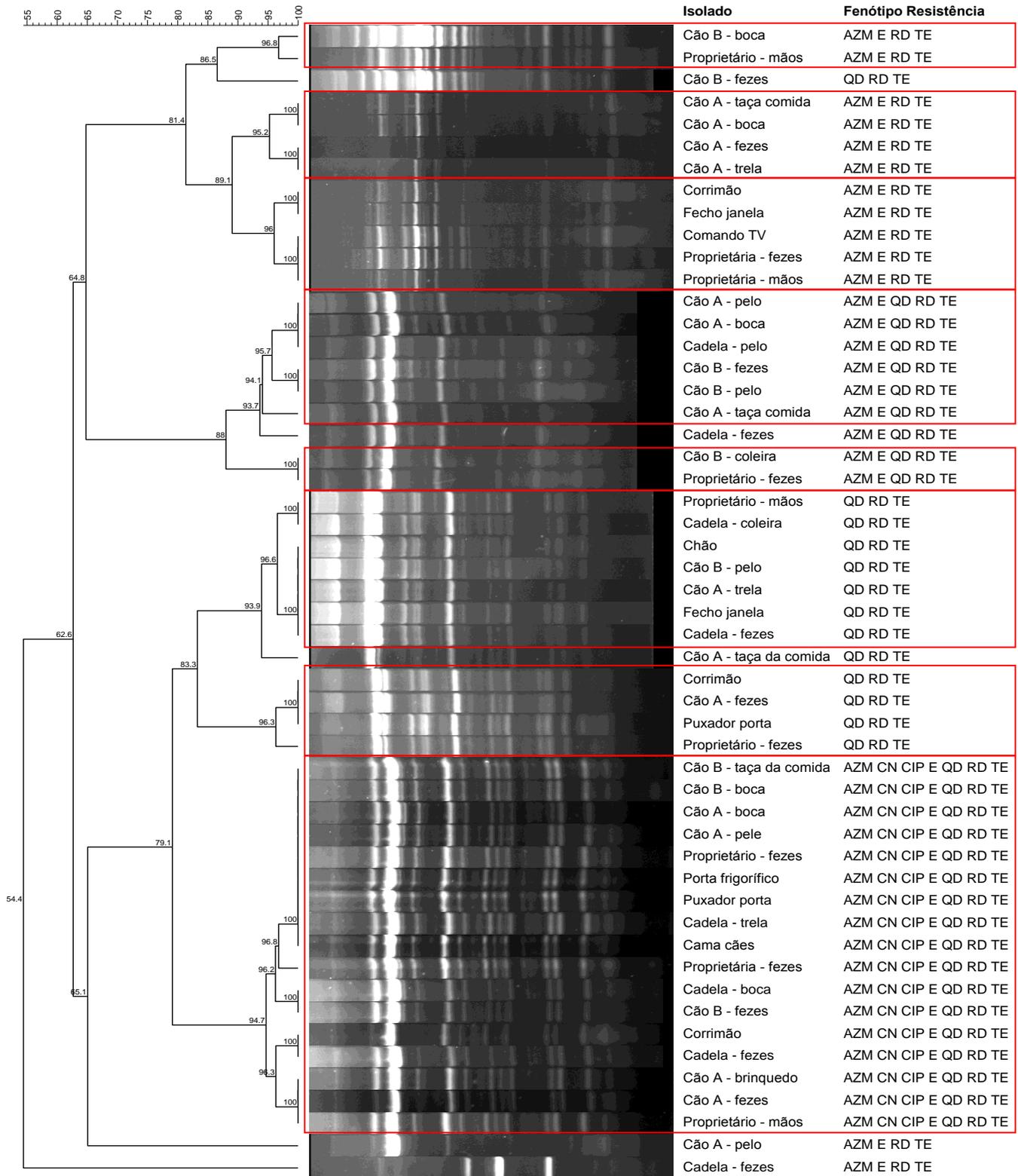


Figura 22 - Padrão de bandas obtido na corrida de electroforese dos produtos resultantes da reacção de ERIC PCR com os isolados recolhidos dos vários locais de amostragem dos quatro conjuntos de fenótipos de *Enterococcus faecalis*. Dendrograma obtido com base no agrupamento UPGMA e cálculo do coeficiente de Dice. A vermelho estão realçados os conjuntos de isolados com similaridade igual ou superior a 94%.

Selecionando todos os isolados dos quatro fenótipos de resistências e analisando em conjunto (Figura 22) com o objetivo de verificar uma possível relação clonal entre os isolados separados por diferentes fenótipos de resistências a antimicrobianos, observa-se a formação de grupos de proximidade clonal (*clusters* de similaridade superior a 94%) apenas entre os isolados com iguais fenótipos. Podemos assim depreender que a divisão de isolados com base no seu perfil de suscetibilidades microbianas é, numa primeira fase, um bom critério de seleção, para este tipo de estudos.

Capítulo IV – Conclusão

Relativamente ao primeiro trabalho de investigação, de um conjunto de isolados de *E. coli* recolhidos por zaragoas fecais em cem animais de companhia aleatoriamente selecionados, que por motivo de doença ou consulta de rotina, passaram pelas instalações do hospital veterinário UPVET, verificamos que foi possível o isolamento de pelo menos quarenta estirpes multirresistentes e produtoras de ESBL. A observação do seu perfil de resistência é alarmante pois demonstra a pressão seletiva que está a ocorrer na microbiota destes animais, eventualmente devido à utilização de antimicrobianos em larga escala. Em Portugal existe uma vasta seleção de quinolonas para uso veterinário e, apesar de a única cefalosporina de largo espectro autorizada para o uso em cães e gatos ser a cefovecina, as cefalosporinas vendidas para uso na medicina humana são muitas mais, podendo ser adquiridas em farmácias, o que torna possível o seu uso não controlado na prática da clínica veterinária. A utilização indevida das sobras de tratamentos antimicrobianos anteriores, por decisão dos proprietários, também pode contribuir para a diminuição da eficácia de terapias futuras contribuindo para o desenvolvimento de resistências bacterianas. A utilização de cefalosporinas de 3ª e 4ª geração em animais de produção, pode também levar à transferência de resistências através da cadeia de alimentação, outra das diversas vias potencialmente responsáveis pela emergência de resistências antimicrobianas em animais. Do mesmo modo, tendo em conta que a amostragem foi ao acaso, muitos animais podiam ser saudáveis e ter adquirido múltiplas resistências por transferência horizontal através de elementos genéticos móveis, aquando do contacto com outras bactérias através do meio ambiente, hospitalar, ou no contacto com outros animais e humanos a efetuar terapias com antibióticos, cujas bactérias podem não ter colonizado o animal, mas permaneceram transitoriamente o tempo suficiente para a transferência de genes que conferem características de resistência a diversos antibióticos. A elevada resistência a alguns antibióticos, como o ácido nalidíxico, pode ser explicada pelo uso frequente deste grupo de antimicrobianos no tratamento de infeções do trato urinário e de pele provocadas por bactérias gram-negativo, e ainda a ampicilina, que faz parte da classe de antibióticos mais utilizada em variados tipos de infeções. É importante relembrar também que a presença de resistências às quinolonas está associada à presença de

outras resistências, pois estão integradas numa bateria de genes. Este trabalho tinha como um dos objetivos a caracterização molecular dos genes que possam estar a conferir resistências a duas classes de antibióticos, os β -lactâmicos e as quinolonas. A escolha destas duas classes de antibióticos é devida à verificação de resistência em quase todos os isolados, e também por estarem entre os antibióticos mais prescritos e ainda por geneticamente ser das resistências mais estudadas, podendo-se encontrar rapidamente na bibliografia uma continua descoberta de variantes dos genes quer cromossomais, quer mediados por plasmídeos, que são principalmente responsáveis por codificarem enzimas que degradam facilmente antibióticos ou por originarem alterações nos alvos de ação dos antimicrobianos. Ainda foi verificado que os genes de resistência destas duas classes de antibióticos podem ser transferidos em conjunto, pois encontram-se frequentemente associados aos genes de β -lactamases, genes *bla* (Colodner, 2005). Relativamente à resistência aos β -lactâmicos e pela análise de um trabalho de revisão que demonstra uma compilação de resultados obtidos por diversos autores, na pesquisa de β -lactamases em cães e gatos é possível verificar que algumas β -lactamases são predominantemente encontradas em diversos países, como Portugal, sendo uma dessas β -lactamases a CTX-M-1. Resumidamente, em Portugal foram ainda verificadas em grande percentagem de isolados, as enzimas CTX-M-15, CMY-2 e TEM-52 (Ewers Christa , Grobbel Mirjam , Bethe Astrid & Sebastian, 2011). A constatação em sete isolados da presença da enzima CTX-M-15, a β -lactamase com mais expansão mundialmente e muito encontrada nos humanos, mas também já presente em isolados bacterianos recolhidos de animais de companhia, realça também a possibilidade de transmissão inter-espécie de estirpes multirresistentes e genes de resistência. No entanto, as informações disponíveis sobre β -lactamases de largo espectro em animais de estimação são limitadas, pelo que não são suficientes para fornecer uma boa ideia de quais as β -lactamases que se estão a expandir, pelo que todas as vigilâncias epidemiológicas em animais de companhia são necessárias, de modo a se poder estimar o problema associado a estas resistências. As β -lactamases identificadas nos quarenta isolados deste trabalho vão de encontro aos grupos encontrados na bibliografia, sendo que este trabalho ainda se encontra em conclusão pelo que a sequenciação dos respetivos genes irá permitir classificar os subgrupos dessas enzimas, assim com observar a presença de novas mutações. Estes resultados, quando concluídos, irão fornecer dados importantes relativos ao distrito do Porto, tendo em conta que estudos das prevalências de

genes de resistência em *E. coli* e sua variação de acordo com a distribuição geográfica, ainda são estudos relativamente escassos (Carattoli et al., 2005; Costa et al., 2008; Gandolfi-Decristophoris et al., 2013). Relativamente à resistência às quinolonas constatou-se a sua associação com mutações pontuais nos genes cromossomais *gyrA* e *parC*, codificantes da subunidade A da DNA girase e topoisomerase IV respetivamente. Estas mutações são em princípio adquiridas verticalmente estando relacionadas por uma linhagem filogenética. Apenas em três situações se verificou um determinante de resistência mediado por plasmídeo (*qnrS*) que pode ser transmitido horizontalmente entre diferentes populações bacterianas. Determinou-se ainda a relação filogenética das quarenta estirpes por obtenção do seu filogrupo através da amplificação de três genes que Clermont e colaboradores observaram que a conjugação da sua presença ou ausência, era característica e permitia distinção dos quatro filogrupos. Observou-se uma prevalência do filogrupo A (47,5%) seguido do grupo D (25,0%) e menos verificados foram os grupos B1 (17,5%) e B2 (10,0%). A elevada percentagem do grupo reportado como menos virulento (A) faz acreditar que a maioria destes isolados é comensal. Estirpes pertencentes ao grupo B2, normalmente associadas a problemas extraintestinais, foram verificadas como apresentando o menor número de resistências, ao contrário de alguns trabalhos de outros autores que muitas vezes demonstram que o grupo filogenético B2 é o mais associado a múltiplas resistências (Clermont et al., 2000). No entanto, em vários outros trabalhos recentes, tem sido observada uma deslocação filogenética do grupo B2 para os grupos menos virulentos A (maioritariamente), B1 e D, ao mesmo tempo essa mudança é acompanhada de um aumento da multiresistência a antimicrobianos, tanto em *E. coli* isoladas em ITU (Moreno et al., 2006; Rijavec et al., 2006; Skurnik et al., 2005), como feridas cirúrgicas (Saeed et al., 2009). Assim uma mudança para o filogrupo A pode ser observada e relacionada com um aumento do perfil de multiresistências. Alguns trabalhos em *E. coli* reportam também que integrões parecem estar menos frequentes no filogrupo B2 (Skurnik et al., 2005). Esta elevada prevalência de resistências em isolados fecais de animais de companhia, juntamente com o contacto cada vez mais próximo que é verificado dos proprietários para com os seus animais, alerta para o facto de poder haver transferência bacteriana entre as duas espécies (animais e humanos) o que põe em causa terapias futuras, pois em ambas as espécies aumenta o risco de presença de resistências a antimicrobianos sem terem sido submetidos a terapias com antibióticos. Para o estudo da partilha de clones

bacterianos, é apresentada nesta dissertação outra colaboração num trabalho com isolados bacterianos em agregados familiares constituídos por animais de companhia e humanos, e se possível, análise do respetivo ambiente doméstico. Pretendeu-se assim avaliar se animais e seus proprietários, dentro de um mesmo espaço habitacional, apresentavam estirpes de *E.coli* e *Enterococcus* fecais partilhados, apresentando perfis de PFGE e ERIC e suscetibilidades iguais ou semelhantes. Foram analisados cinco agregados familiares, selecionados com base no animal de estimação apresentar várias terapias antimicrobianas pregressas devido a infeções recorrentes, dos quais a recolha de amostras de fezes, urina, pelo, secreção da mucosa oral, fezes dos proprietários e ainda zaragatoas das suas mãos e de objetos domésticos, já tinha sido realizada e analisados os fenótipos de resistência, permitindo assim a observação de vários fenótipos de multirresistência e o agrupamento de vários isolados que à primeira vista pareciam ser semelhantes, e, possivelmente derivados de um mesmo clone bacteriano, embora originários em diferentes hospedeiros. Com alguns isolados representantes dos vários fenótipos e locais de recolha partiu-se para a tipagem genética por ERIC PCR ou PFGE, que permitiu confirmar que muitos dos isolados presentes na boca e fezes dos animais, se encontravam partilhados com os seus proprietários, estando presentes frequentemente nas suas mãos e fezes, podendo esta transferência ter ocorrido diretamente ou ainda traves da partilha de um mesmo espaço e objetos comuns como brinquedos, taças de alimentação, chão, corrimãos, portas e puxadores, nos quais foi observada uma disseminação dessas estirpes, que apresentam assim capacidade de sobreviver no ambiente (onde, como esperado, a maioria desses isolados pertencia ao grupo A). Foram verificadas também a presença de estirpes do filogruppo D, sendo apenas encontradas em fezes, mucosa oral e pele/pelo do animal. Esta partilha de clones foi também verificada relativamente aos enterococos, sendo os isolados obtidos pertencentes à espécie *E. faecalis*. Esta transferência de enterococos com várias resistências é igualmente eficaz entre vários objetos, animais e humanos. As várias relações de proximidade clonal foram analisadas tendo em conta o *cutoff* de 94% frequentemente observado em trabalhos similares (Johnson & Clabots, 2006; Johnson et al., 2008; Stenske et al., 2009), que correspondem a diferenças de até três bandas no padrão obtido por electroforese. Com base na análise dos inquéritos efetuados aos proprietários, foi possível associar alguns comportamentos básicos à transferência e disseminação de clones bacterianos, no entanto a direção da transmissão é sempre muito difícil de avaliar, podendo ocorrer ambos

os sentidos. Verificou-se que as pessoas com quem são partilhadas estirpes bacterianas são os proprietários que mais contacto têm com o animal. A coprofagia e lambedura peri-genital também podem ser responsáveis pela disseminação de estirpes fecais para a mucosa oral e posteriormente por lambidelas, transferência para o seu pelo, assim como para a pele e mãos dos seus proprietários. A partilha de utensílios pelos mesmos animais de um agregado familiar também pode ser responsável pela aquisição de estirpes bacterianas multirresistentes de outros animais que possam estar sujeitos a múltiplas terapias antimicrobianas. Estas são apenas hipóteses que não foram validadas estatisticamente. No entanto, não se pode excluir, que nos animais cuja alimentação é em parte a mesma que a dos proprietários, que a via alimentar possa ser responsável por disseminar antibiorresistências, quer por colonização do trato intestinal de bactérias presentes nos alimentos, ou caso as bactérias não apresentem essa capacidade, por transmissão de elementos genéticos, verificando-se assim partilha de clones bacterianos iguais entre humanos e animais que convivem. Essa variável pode ser introduzida em estudos futuros. Não se pode igualmente por totalmente de parte a transferência bacteriana no sentido humano-animal, pois mesmo que estes não tenham feito terapias antimicrobianas, podem sempre ter adquirido estirpes bacterianas dentro ou fora do contexto familiar, transportando-as posteriormente para este. No entanto na maioria das vezes podemos relacionar o fenótipo apresentado pelas estirpes partilhadas, com a terapia antimicrobiana pregressa do animal. Também se pode concluir, como esperado, que os animais que mais tratamentos com antibióticos realizaram, são os portadores mais frequentes de estirpes multirresistentes.

As duas técnicas de tipagem utilizadas neste trabalho poderão também ser avaliadas, concluindo-se que o PFGE apresenta maior reprodutibilidade e precisão, gerando um grande número de fragmentos de DNA, representando uma grande porção do genoma bacteriano, ideal para a comparação de um padrão de bandas entre estirpes. ERIC PCR permitiu também a discriminação entre estirpes, quer em bactérias gram-negativo como gram-positivo, apontando no mesmo sentido e conclusões do PFGE, no entanto com um número de bandas inferiores e sendo mais influenciado pela variabilidade inter-experiências (experiências e corridas diferentes), relacionando os diferentes isolados por *clusters* com similaridades mais afastadas. Ao longo deste trabalho foi também verificado um problema na tipagem de algumas estirpes por PFGE cuja corrida em electroforese se revelava sempre como um borrão, correspondente

ao DNA degradado. Algumas alterações como o aumento da concentração de proteinase K bem como a adição de tiourea ao gel e *buffer* de corrida permitiram a digestão eficaz com a enzima de restrição e visualização do padrão de bandas resultante. No entanto continuou a ser das corridas de electroforese onde a distinção de bandas é menos perceptível, pelo que se poderia testar o aumento do tempo de incubação com proteinase K para mais que *overnight* de modo aumentar o tempo para a sua ação, mudando a solução de lavagem diariamente. A degradação do DNA podia ainda ser prevenida pela utilização de *buffer* HEPES em vez de TBE (Koort et al., 2002).

Ambos os trabalhos alertam para a necessidade de cuidados redobrados quando em contacto com animais e humanos a efetuar terapias com antimicrobianos. Alertam ainda para a necessidade de estes serem utilizados prudentemente, seguindo as guias de prescrição de antimicrobianos, sendo preceituados apenas em situações necessárias, e com o espectro adequado, verificado após realização de testes de análise e identificação da espécie em questão e da sua suscetibilidade antimicrobiana. Se esses cuidados devem ser tidos em especial atenção na medicina humana, pois já foram verificados vários casos de mortalidade, devem também ser tidos na medicina veterinária pois cada vez mais se observa uma pressão seletiva na flora microbiana destes animais, que apresentam também uma grande facilidade em transferir as suas bactérias para outros animais e até humanos e ainda pelo ambiente em que se encontram, facilitando a sua disseminação. A vigilância e monitorização de bactérias produtoras de ESBL, e da utilização de diferentes agentes antimicrobianos, deve-se, assim, focar não só em animais de consumo, mas também em animais de companhia, que, em pequena escala já é tida em conta em alguns programas como os levados a cabo na Dinamarca (DANMAP), Alemanha (GERM-Vet), e Suécia (SVARM). Ao mesmo tempo, e tal como os protocolos já implementados na clinica em humanos, cuidados de higiene, sistemas de controlo e prevenção de infeções, devem ser adaptados também às clinicas veterinárias (Ewers, Grobbel, Bethe & Sebastian, 2011).

Perspetivas futuras

Para trabalhos futuros é pretendido o aumento do número de isolados fecais tanto de cães como gatos, para se poder estudar em maior escala a prevalência da presença de alguns genes de resistências aos β -lactâmicos e quinolonas em animais de companhia, assim como alargar a pesquisa de genes a outros grupos antimicrobianos, cujas resistências também são muito verificadas, como os aminoglicosídeos, as tetraciclinas, fenicois, glicopéptidos e trimetoprim-sulfa.

Poder-se-á ainda, aumentar o número de agregados familiares de modo a obter mais casos representativos da transferência clonal entre diferentes espécies e disseminação para espaços domésticos, assim como incluir outras variáveis e aprofundar o estudo cruzando resultados com dados dos inquéritos, efetuando para isso uma análise estatística. Pretende-se também futuramente proceder à caracterização molecular dos genes que conferem resistências aos β -lactâmicos e às quinolonas nesses isolados, pois irão conferir informações relevantes para a confirmação e discussão da disseminação de clones bacterianos nos diferentes agregados e respetivas consequências.

Pretende-se ainda otimizar a técnica de PFGE para *Enterococcus* spp. de modo a obter conclusões mais precisas sobre a sua disseminação, já que também revela ser uma espécie ubíqua e com grande capacidade de disseminação e sobrevivência no ambiente. Assim como testar outras condições que permitam uma melhor digestão e visualização dos perfis de PFGE, das amostras que se revelam inicialmente não tipáveis.

Referências Bibliográficas

- Abdul-razzaq, M. S., & Abdul-lateef, L. A. (2011). Molecular phylogeny of *Escherichia coli* isolated from clinical samples in Hilla, Iraq. *African Journal of Biotechnology*, *10*(70), 15783–15787.
- Alonso, A., Sanchez, P., & Martinez, J. L. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental microbiology*, *3*(1), 1–9.
- Alonso, R. (2005). An improved protocol for pulsed-field gel electrophoresis typing of *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*, *54*(2), 155–157.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *289*(1036), 321–31.
- Anderson, K. L., Whitlock, J. E., & Harwood, V. J. (2005). Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Applied and environmental microbiology*, *71*(6), 3041–8.
- Baldy-Chudzik, K., Mackiewicz, P., & Stosik, M. (2008). Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. *Veterinary microbiology*, *131*(1-2), 173–84.
- Barber, D. A., Miller, G. Y., & McNamara, P. E. (2003). Models of antimicrobial resistance and foodborne illness: examining assumptions and practical applications. *Journal of food protection*, *66*(4), 700–9.
- Barrett, T. J., Lior, H., Green, J. H., Khakhria, R., Wells, J. G., Bell, B. P., ... Griffin, P. M. (1994). Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *Journal of clinical microbiology*, *32*(12), 3013–7.
- Bates, J., Jordens, J. Z., & Griffiths, D. T. (1994). Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *34*(4), 507–14.
- Berge, A. C. B., Moore, D. A., & Sischo, W. M. (2006). Field trial evaluating the influence of prophylactic and therapeutic antimicrobial administration on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* in dairy calves. *Applied and environmental microbiology*, *72*(6), 3872–8.
- Bergthorsson, U., & Ochman, H. (1998). Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Molecular biology and evolution*, *15*(1), 6–16.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., ... Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (New York, N.Y.)*, *277*(5331), 1453–62.
- Bonacorsi, S. P., Clermont, O., Tinsley, C., Le Gall, I., Beaudoin, J. C., Elion, J., ... Bingen, E. (2000). Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. *Infection and immunity*, *68*(4), 2096–101.
- Bonnet, R. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *48*(1), 1-14.
- Bush, K. (1988). Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clinical microbiology reviews*, *1*(1), 109–23.

- Bush, K, Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(6), 1211–33.
- Bush, Karen. (2010). Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Current opinion in microbiology*, 13(5), 558–64.
- Bush, Karen, & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969–76.
- Carattoli, A., Lovari, S., Franco, A., Cordaro, G., Matteo, P. Di, & Battisti, A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* Isolated from Dogs and Cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(2), 833–835.
- Carlos, C., Pires, M. M., Stoppe, N. C., Hachich, E. M., Sato, M. I. Z., Gomes, T. a T., ... Ottoboni, L. M. M. (2010). *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC microbiology*, 10, 161.
- Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.-J., & Nordmann, P. (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(2), 394–7.
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Xia, S., & Aarestrup, F. M. (2009). qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(2), 603–8.
- Cesaro, A., Bettoni, R. R. D., Lascols, C., Mérens, A., Soussy, C. J., & Cambau, E. (2008). Low selection of topoisomerase mutants from strains of *Escherichia coli* harbouring plasmid-borne qnr genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61(5), 1007–15.
- Cetinkaya, Y., Falk, P., & Mayhall, C. G. (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 686–707.
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840–62.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4555–8.
- Colodner, R. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. *American journal of infection control*, 33(2), 104–7.
- Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Coelho, A. C., Rodrigues, J., Torres, C., ... Vinué, L. (2008). Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Veterinary microbiology*, 127(1-2), 97–105.
- D'Andrea, M. M., Arena, F., Pallecchi, L., & Rossolini, G. M. (2013). CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 303(6-7), 305–17.
- Da Silva, G. J., & Mendonça, N. (2012). Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence*, 3(1), 18–28.

- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(3), 490–5.
- De Bruijn, F. J. (1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 58(7), 2180–7.
- De la Puente-Redondo, V. A., del Blanco, N. G., Gutiérrez-Martín, C. B., García-Peña, F. J., & Rodríguez Ferri, E. F. (2000). Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), 1016–22.
- Deasy, B. M., Rea, M. C., Fitzgerald, G. F., Cogan, T. M., & Beresford, T. P. (2000). A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Systematic and applied microbiology*, 23(4), 510–22.
- Descheemaeker, P., Lammens, C., Pot, B., Vandamme, P., & Goossens, H. (1997). Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. *International journal of systematic bacteriology*, 47(2), 555–61.
- Desjardins, P., Picard, B., Kaltenböck, B., Elion, J., & Denamur, E. (1995). Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the clonal structure of the population: evidence from random amplified polymorphic DNA and restriction-fragment-length polymorphism. *Journal of molecular evolution*, 41(4), 440–8.
- Di Giovanni, G. D., Watrud, L. S., Seidler, R. J., & Widmer, F. (1999). Fingerprinting of mixed bacterial strains and BIOLOG gram-negative (GN) substrate communities by enterobacterial repetitive intergeneric consensus sequence-PCR (ERIC-PCR). *Current microbiology*, 38(4), 217–23.
- Dierikx, C. M., van Duijkeren, E., Schoormans, a H. W., van Essen-Zandbergen, a, Veldman, K., Kant, a, ... Mevius, D. J. (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(6), 1368–74.
- Domig, K. J., Mayer, H. K., & Kneifel, W. (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 165–88.
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., & Jarlier, V. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 Suppl 1, 90–103.
- Dunne, W. M., & Wang, W. (1997). Clonal dissemination and colony morphotype variation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in metropolitan Detroit, Michigan. *Journal of clinical microbiology*, 35(2), 388–92.
- Ejrnaes, K., Sandvang, D., Lundgren, B., Ferry, S., Holm, S., Monsen, T., ... Frimodt-moller, N. (2006). Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of *Escherichia coli* Strains from Samples Collected before and after Pivmecillinam or Placebo Treatment of Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection in Women. *Journal of clinical microbiology*, 44(5), 1776–1781.

- Elliot, D. L., Tolle, S. W., Goldberg, L., & Miller, J. B. (1985). Pet-associated illness. *The New England journal of medicine*, 313(16), 985–95.
- Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.-B., Bui, H., Le Bouguéneq, C., & Denamur, E. (2004). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Molecular biology and evolution*, 21(6), 1085–94.
- Escobar-Páramo, P., Le Menac'h, A., Le Gall, T., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., ... Denamur, E. (2006). Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environmental microbiology*, 8(11), 1975–84.
- Escobar-Páramo, P., Sabbagh, A., Darlu, P., Pradillon, O., Vaury, C., Denamur, E., & Lecointre, G. (2004). Decreasing the effects of horizontal gene transfer on bacterial phylogeny: the *Escherichia coli* case study. *Molecular phylogenetics and evolution*, 30(1), 243–50.
- Ewers, C., Bethe, a, Semmler, T., Guenther, S., & Wieler, L. H. (2012). Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(7), 646–55.
- Ewers Christa , Grobbel Mirjam , Bethe Astrid, W. L. H., & Sebastian, G. (2011). Extended-spectrum beta-lactamases- producing Gram-negative bacteria in companion animals: action is clearly warranted! *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*, 4(124), 94–101.
- Ewers, Christa, Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P. a, Diehl, I., Semmler, T., ... Guenther, S. (2010). Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(4), 651–60.
- Fawley, W. N., & Wilcox, M. H. (2002). Pulsed-field gel electrophoresis can yield DNA fingerprints of degradation-susceptible *Clostridium difficile* strains. *Journal of clinical microbiology*, 40(9), 3546–7.
- Feizabadi, M. M., Ghodousi, A., Nomanpour, B., Omrani, M., & Shahcheraghi, F. (2011). Development of a modified DNA extraction method for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Staphylococcus aureus* and enterococci without using lysostaphin. *Journal of microbiological methods*, 84(1), 144–6.
- Fernandes, R., Amador, P., & Prudêncio, C. (2013). β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*, 24(1), 7–17.
- Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(Pt 6), 1749–57.
- Franz, C. M. A. P., van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., & Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS microbiology reviews*, 31(3), 293–310.
- Gandolfi-Decristophoris, P., Petrini, O., Ruggeri-Bernardi, N., & Schelling, E. (2013). Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthy companion animals living in nursing homes and in the community. *American journal of infection control*, 1–5.
- Gautom, R. K. (1997). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *Journal of clinical microbiology*, 35(11), 2977–80.

- Gibson, J. S., Cobbold, R. N., Kyaw-Tanner, M. T., Heisig, P., & Trott, D. J. (2010). Fluoroquinolone resistance mechanisms in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections in dogs. *Veterinary microbiology*, *146*(1-2), 161–6.
- Giske, C. G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D. L., ... Walsh, T. R. (2009). Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *63*(1), 1–4.
- Goering, R. V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, *10*(7), 866–75.
- Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R., & Elseviers, M. (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*, *365*(9459), 579–87.
- Gordon, D. M., Clermont, O., Tolley, H., & Denamur, E. (2008). Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental microbiology*, *10*(10), 2484–96.
- Gordon, D. M., & Cowling, A. (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*, *149*(Pt 12), 3575–86.
- Guardabassi, L., Schwarz, S., & Lloyd, D. H. (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *54*(2), 321–32.
- Harvey, R. G., Marples, R. R., & Noble, W. C. (1994). Nasal Carriage of *Staphylococcus intermedius* in Humans in Contact with Dogs. *Microbial Ecology in Health and Disease*, *7*(4), 225–227.
- Harwood, V. J., Delahoya, N. C., Ulrich, R. M., Kramer, M. F., Whitlock, J. E., Garey, J. R., & Lim, D. V. (2004). Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Letters in applied microbiology*, *38*(6), 476–82.
- Hawkey, P. M., & Jones, A. M. (2009). The changing epidemiology of resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *64 Suppl 1*, i3–10.
- Heritage, J. (1999). Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *44*(3), 309–318.
- Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M., & Whittam, T. S. (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, *172*(11), 6175–81.
- Hooper, D. C. (1999). Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, *2*(1), 38–55.
- Hordijk, J., Schoormans, A., Kwakernaak, M., Duim, B., Broens, E., Dierikx, C., ... Wagenaar, J. a. (2013). High prevalence of fecal carriage of extended spectrum β -lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs. *Frontiers in microbiology*, *4*(August), 242.
- Huber, H., Zweifel, C., Wittenbrink, M. M., & Stephan, R. (2013). ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Switzerland. *Veterinary microbiology*, *162*(2-4), 992–6.

- Hulton, C. S., Higgins, C. F., & Sharp, P. M. (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular microbiology*, 5(4), 825–34.
- Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., & Barrett, J. B. (2004). Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3558–65.
- Jacoby, G. a. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 22(1), 161–82.
- Jacoby, G. A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical infectious disease: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41 Suppl 2, S120–6.
- Johnson, J R, Brown, J. J., Carlino, U. B., & Russo, T. A. (1998). Colonization with and acquisition of uropathogenic *Escherichia coli* as revealed by polymerase chain reaction-based detection. *The Journal of infectious diseases*, 177(4), 1120–4.
- Johnson, J R, Clabots, C., Azar, M., Boxrud, D. J., Besser, J. M., & Thurn, J. R. (2001). Molecular analysis of a hospital cafeteria-associated salmonellosis outbreak using modified repetitive element PCR fingerprinting. *Journal of clinical microbiology*, 39(10), 3452–60.
- Johnson, J R, Delavari, P., Kuskowski, M., & Stell, A. L. (2001). Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *The Journal of infectious diseases*, 183(1), 78–88.
- Johnson, J R, Delavari, P., Stell, A. L., Whittam, T. S., Carlino, U., & Russo, T. A. (2001). Molecular comparison of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of the same electrophoretic lineages from humans and domestic animals. *The Journal of infectious diseases*, 183(1), 154–9.
- Johnson, J R, & O’Bryan, T. T. (2000). Improved repetitive-element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 7(2), 265–73.
- Johnson, J R, O’Bryan, T. T., Low, D. A., Ling, G., Delavari, P., Fasching, C., ... Stell, A. L. (2000). Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express papG allele III. *Infection and immunity*, 68(6), 3327–36.
- Johnson, J R, Stell, A. L., & Delavari, P. (2001). Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 69(3), 1306–14.
- Johnson, J R, & Clabots, C. (2006). Sharing of virulent *Escherichia coli* clones among household members of a woman with acute cystitis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43(10), e101–8.
- Johnson, J R, Owens, K., Gajewski, A., & Clabots, C. (2008). *Escherichia coli* colonization patterns among human household members and pets, with attention to acute urinary tract infection. *The Journal of infectious diseases*, 197(2), 218–24.
- Johnson, J R, Stell, A. L., & Delavari, P. (2001). Canine Feces as a Reservoir of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of Urology*, 69(3).
- Johnson, J R, van der Schee, C., Kuskowski, M. A., Goessens, W., & van Belkum, A. (2002). Phylogenetic background and virulence profiles of fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* isolates from the Netherlands. *The Journal of infectious diseases*, 186(12), 1852–6.

- Jurkovic, D., Krizková, L., Sojka, M., Takáčová, M., Dusinský, R., Krajcovic, J., ... Vancanneyt, M. (2007). Genetic diversity of *Enterococcus faecium* isolated from Bryndza cheese. *International journal of food microbiology*, 116(1), 82–7.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 123–40.
- Kariyama, R., Mitsuhata, R., Chow, J. W., Clewell, D. B., & Kumon, H. (2000). Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of clinical microbiology*, 38(8), 3092–5.
- Koort, J. M. K., Lukinmaa, S., Rantala, M., Unkila, E., & Siitonen, A. (2002). Technical improvement to prevent DNA degradation of enteric pathogens in pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of clinical microbiology*, 40(9), 3497–8.
- Lascols, C., Robert, J., Cattoir, V., Bébéar, C., Cavallo, J.-D., Podglajen, I., ... Cambau, E. (2007). Type II topoisomerase mutations in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and other enterobacterial species harbouring the *qnrA* gene. *International journal of antimicrobial agents*, 29(4), 402–9.
- Lavigne, J.-P., Marchandin, H., Delmas, J., Bouziges, N., Lecaillon, E., Cavalie, L., ... Sotto, A. (2006). *qnrA* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(12), 4224–8.
- Le Gall, T., Clermont, O., Gouriou, S., Picard, B., Nassif, X., Denamur, E., & Tenaillon, O. (2007). Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Molecular biology and evolution*, 24(11), 2373–84.
- Lecointre, G., Rachdi, L., Darlu, P., & Denamur, E. (1998). *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Molecular biology and evolution*, 15(12), 1685–95.
- Leung, K. T., Mackereth, R., Tien, Y.-C., & Topp, E. (2004). A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources. *FEMS microbiology ecology*, 47(1), 111–9.
- Liu, X., Boothe, D. M., Thungrat, K., & Aly, S. (2012). Mechanisms accounting for fluoroquinolone multidrug resistance *Escherichia coli* isolated from companion animals. *Veterinary microbiology*, 161(1-2), 159–68.
- Loubinoux, J., Lozniewski, A., Lion, C., Garin, D., Weber, M., & Le Faou, A. E. (1999). Value of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR for study of *Pasteurella multocida* strains isolated from mouths of dogs. *Journal of clinical microbiology*, 37(8), 2488–92.
- Magalhães, V. D., Ferreira, J. C., Barelli, C., & Darini, A. L. C. (2005). Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 64(2), 155–161.
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M., & Martínez-Bueno, M. (2009). Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International journal of food microbiology*, 132(1), 24–32.
- Matushek, M. G., Bonten, M. J., & Hayden, M. K. (1996). Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of clinical microbiology*, 34(10), 2598–600.

- McDonald, L. C., Chen, F. J., Lo, H. J., Yin, H. C., Lu, P. L., Huang, C. H., ... Ho, M. (2001). Emergence of reduced susceptibility and resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* in Taiwan and contributions of distinct selective pressures. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *45*(11), 3084–91.
- McKessar, S. J., Berry, A. M., Bell, J. M., Turnidge, J. D., & Paton, J. C. (2000). Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *44*(11), 3224–8.
- Meacham, K. J., Zhang, L., Foxman, B., Bauer, J., Marrs, C. F., & Bauer, R. J. (2003). Evaluation of Genotyping Large Numbers of *Escherichia coli* Isolates by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(11), 5224–5226.
- Mendonça, N., Leitão, J., Manageiro, V., Ferreira, E., & Caniça, M. (2007). Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *51*(6), 1946–55.
- Migliavacca, R., Nucleo, E., D'Andrea, M. M., Spalla, M., Giani, T., & Pagani, L. (2007). Acquired AmpC type beta-lactamases: an emerging problem in Italian long-term care and rehabilitation facilities. *The new microbiologica*, *30*(3), 295–8.
- Moellering, R. C. (1992). Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *14*(6), 1173–6.
- Moreno, E., Prats, G., Sabaté, M., Pérez, T., Johnson, J. R., & Andreu, A. (2006). Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *57*(2), 204–11.
- Morrison, D., Woodford, N., Barrett, S. P., Sisson, P., & Cookson, B. D. (1999). DNA banding pattern polymorphism in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and criteria for defining strains. *Journal of clinical microbiology*, *37*(4), 1084–91.
- Murphy, C., Reid-Smith, R. J., Prescott, J. F., Bonnett, B. N., Poppe, C., Boerlin, P., ... McEwen, S. a. (2009). Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study. *The Canadian veterinary journal*, *50*(10), 1047–53.
- Nayak, B. S., Badgley, B., & Harwood, V. J. (2011). Comparison of genotypic and phylogenetic relationships of environmental *Enterococcus* isolates by BOX-PCR typing and 16S rRNA gene sequencing. *Applied and environmental microbiology*, *77*(14), 5050–5.
- Neimann, J., Engberg, J., Mølbak, K., & Wegener, H. C. (2003). A case-control study of risk factors for sporadic campylobacter infections in Denmark. *Epidemiology and infection*, *130*(3), 353–66.
- Nicolas-Chanoine, M.-H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M. P., Caniça, M. M., ... Johnson, J. R. (2008). Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *61*(2), 273–81.
- Nowrouzian, F. L., Wold, A. E., & Adlerberth, I. (2005). *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *The Journal of infectious diseases*, *191*(7), 1078–83.

- Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. A., Sahm, D., & Hooper, D. C. (2006). Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(11), 3953–5.
- Patel, R., Uhl, J. R., Kohner, P., Hopkins, M. K., & Cockerill, F. R. (1997). Multiplex PCR detection of vanA, vanB, vanC-1, and vanC-2/3 genes in enterococci. *Journal of clinical microbiology*, 35(3), 703–7.
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 657–86.
- Pérez-Hernández, X., Méndez-Alvarez, S., & Claverie-Martín, F. (2002). A PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 42(4), 273–7.
- Périchon, B., Courvalin, P., & Galimand, M. (2007). Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(7), 2464–9.
- Perichon, B., Reynolds, P., & Courvalin, P. (1997). VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(9), 2016–8.
- Pettigrew, M. M., Foxman, B., Ecevit, Z., Marrs, C. F., & Gilsdorf, J. (2002). Use of pulsed-field gel electrophoresis, enterobacterial repetitive intergenic consensus typing, and automated ribotyping to assess genomic variability among strains of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Journal of clinical microbiology*, 40(2), 660–2.
- Pfeifer, Y., Cullik, A., & Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International journal of medical microbiology*, 300(6), 371–9.
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., ... Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and immunity*, 67(2), 546–53.
- Pinto, L., Radhouani, H., Coelho, C., Martins da Costa, P., Simões, R., Brandão, R. M. L., ... Poeta, P. (2010). Genetic detection of extended-spectrum beta-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates from birds of prey from Serra da Estrela Natural Reserve in Portugal. *Applied and environmental microbiology*, 76(12), 4118–20.
- Poyart, C., Quesnes, G., & Trieu-Cuot, P. (2000). Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *Journal of clinical microbiology*, 38(1), 415–8.
- Ray, T., Mills, A., & Dyson, P. (1995). Tris-dependent oxidative DNA strand scission during electrophoresis. *Electrophoresis*, 16(6), 888–94.
- Rijavec, M., Müller-Premru, M., Zakotnik, B., & Zgur-Bertok, D. (2008). Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *Journal of medical microbiology*, 57(Pt 11), 1329–34.
- Rijavec, M., Starcic Erjavec, M., Ambrozic Avgustin, J., Reissbrodt, R., Fruth, A., Krizan-Hergouth, V., & Zgur-Bertok, D. (2006). High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. *Current microbiology*, 53(2), 158–62.

- Sabarinath, A., Tiwari K, P., Deallie, C., Belot, G., Vanpee, G., Matthew, V., ... Hariharan, H. (2011). Antimicrobial Resistance and Phylogenetic Groups of Commensal Escherichia Coli Isolates from Healthy Pigs in Grenada, *WebmedCentral* 2(5).
- Sabaté, M., Moreno, E., Pérez, T., Andreu, A., & Prats, G. (2006). Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic Escherichia coli isolates. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12(9), 880–6.
- Saeed, M. A., Haque, A., Ali, A., Mohsin, M., Bashir, S., Afzal, A., ... Sarwar, Y. (2009). Relationship of drug resistance to phylogenetic groups of *E. coli* isolates from wound infections. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 22:3 (9), 667–70.
- Salfield, N. J., & Pugh, E. J. (1987). Campylobacter enteritis in young children living in households with puppies. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 294(6563), 21–2.
- Sanchez, S., Stevenson, M. A. M., Hudson, C. R., Maier, M., Buffington, T., Dam, Q., & Maurer, J. J. (2002). Characterization of Multidrug-Resistant Escherichia coli Isolates Associated with Nosocomial Infections in Dogs. *Journal of clinical microbiology*, 40(10), 3586–3595.
- Sannes, M. R., Kuskowski, M. A., & Johnson, J. R. (2004). Antimicrobial resistance of Escherichia coli strains isolated from urine of women with cystitis or pyelonephritis and feces of dogs and healthy humans. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(3), 368–73.
- Savichtcheva, O., & Okabe, S. (2006). Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water research*, 40(13), 2463–76.
- Saxena, M. K., Singh, V. P., Lakhcharua, B. D., Taj, G., & Sharma, B. (2002). Strain differentiation of Indian isolates of Salmonella by ERIC-PCR. *Research in veterinary science*, 73(3), 313–4.
- Schink, A.-K., Kadlec, K., & Schwarz, S. (2011). Analysis of bla(CTX-M)-carrying plasmids from Escherichia coli isolates collected in the BfT-GermVet study. *Applied and environmental microbiology*, 77(20), 7142–6.
- Schouten, M. A., Hoogkamp-Korstanje, J. A., Meis, J. F., & Voss, A. (2000). Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 19(11), 816–22.
- Shaheen, B. W., Boothe, D. M., Oyarzabal, O. A., & Smaha, T. (2010). Antimicrobial resistance profiles and clonal relatedness of canine and feline Escherichia coli pathogens expressing multidrug resistance in the United States. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 24(2), 323–30.
- Simões, R. R., Poirel, L., Da Costa, P. M., & Nordmann, P. (2010). Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant Escherichia coli. *Emerging infectious diseases*, 16(1), 110–2.
- Sjölund, M., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Bengtsson, S., Cederbrant, G., Pinhassi, J., ... Olsen, B. (2008). Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. *Emerging infectious diseases*, 14(1), 70–2.
- Skurnik, D., Le Menac'h, A., Zurakowski, D., Mazel, D., Courvalin, P., Denamur, E., ... Ruimy, R. (2005). Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of Escherichia coli isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(7), 3062–5.

- Skurnik, D., Ruimy, R., Andremont, A., Amorin, C., Rouquet, P., Picard, B., & Denamur, E. (2006). Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *57*(6), 1215–9.
- Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Herman, L., ... Butaye, P. (2010). Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS microbiology reviews*, *34*(3), 295–316.
- Soto, S. M., Guerra, B., del Cerro, A., González-Hevia, M. A., & Mendoz, M. C. (2001). Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* serovar panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance. *International journal of food microbiology*, *71*(1), 35–43.
- Stehr-Green, J. K., & Schantz, P. M. (1987). The impact of zoonotic diseases transmitted by pets on human health and the economy. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, *17*(1), 1–15.
- Stenske, K. A., Bemis, D. A., Gillespie, B. E., D'Souza, D. H., Oliver, S. P., Draughon, F. A., ... Souza, D. H. D. (2009). Comparison of clonal relatedness and antimicrobial susceptibility of fecal *Escherichia coli* from healthy dogs and their owners. *American journal of veterinary research*, *70*(9), 1108–16.
- Stubbs, S., Corkill, J. E., Graham, R., & Hart, C. A. (2000). Pulsed-field gel electrophoresis of degradation-sensitive DNAs from *Clostridium difficile* PCR ribotype 1 strains. *Journal of clinical microbiology*, *38*(7), 2791–2.
- Te Witt, R., van Belkum, A., MacKay, W. G., Wallace, P. S., & van Leeuwen, W. B. (2010). External quality assessment of the molecular diagnostics and genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, *29*(3), 295–300.
- Teng, F., Jacques-Palaz, K. D., Weinstock, G. M., & Murray, B. E. (2002). Evidence that the enterococcal polysaccharide antigen gene (*epa*) cluster is widespread in *Enterococcus faecalis* and influences resistance to phagocytic killing of *E. faecalis*. *Infection and immunity*, *70*(4), 2010–5.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*, *33*(9), 2233–9.
- Toleman, M. A., Bennett, P. M., & Walsh, T. R. (2006). ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, *70*(2), 296–316.
- Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., ... Denamur, E. (2009). Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS genetics*, *5*(1), e1000344.
- Turabelidze, D., Kotetishvili, M., Kreger, a, Morris, J. G., & Sulakvelidze, a. (2000). Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. *Journal of clinical microbiology*, *38*(11), 4242–5.
- Ulrich, R. L., & Hughes, T. a. (2001). A rapid procedure for isolating chromosomal DNA from *Lactobacillus* species and other Gram-positive bacteria. *Letters in applied microbiology*, *32*(1), 52–6.

- Valenzuela, A. S., Benomar, N., Abriouel, H., Cañamero, M. M., & Gálvez, A. (2010). Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food microbiology*, 27(7), 955–61.
- Van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N. K., ... Struelens, M. (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13 Suppl 3, 1–46.
- Van den Bogaard, A. E., & Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International journal of antimicrobial agents*, 14(4), 327–35.
- Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Björkroth, K. J., ... Holzapfel, W. H. (2002). Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Applied and environmental microbiology*, 68(3), 1381–91.
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research*, 19(24), 6823–31.
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., & Carattoli, A. (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(12), 2518–29.
- Voith, V. L. (1985). Attachment of people to companion animals. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 15(2), 289–95.
- Walk, S. T., Alm, E. W., Calhoun, L. M., Mladonicky, J. M., & Whittam, T. S. (2007). Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environmental microbiology*, 9(9), 2274–88.
- Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., ... Wang, M. (2009). New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(5), 1892–7.
- Wegener, H. C., Aarestrup, F. M., Gerner-Smidt, P., & Bager, F. (1999). Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. *Acta veterinaria Scandinavica. Supplementum*, 92, 51–7.
- Wei, G., Pan, L., Du, H., Chen, J., & Zhao, L. (2004). ERIC-PCR fingerprinting-based community DNA hybridization to pinpoint genome-specific fragments as molecular markers to identify and track populations common to healthy human guts. *Journal of microbiological methods*, 59(1), 91–108.
- Weijtens, M. J., Reinders, R. D., Urlings, H. A., & Van der Plas, J. (1999). *Campylobacter* infections in fattening pigs; excretion pattern and genetic diversity. *Journal of applied microbiology*, 86(1), 63–70.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., ... Achtman, M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular microbiology*, 60(5), 1136–51.
- Wong, H. C., & Lin, C. H. (2001). Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. *Journal of clinical microbiology*, 39(12), 4233–40.
- Woodford, N. (1998). Glycopeptide-resistant enterococci: a decade of experience. *Journal of medical microbiology*, 47(10), 849–62.

- Woods, C. R., Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1993). Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. *Journal of clinical microbiology*, *31*(7), 1927–31.
- Wyckoff, E. E., Duncan, D., Torres, A. G., Mills, M., Maase, K., & Payne, S. M. (1998). Structure of the *Shigella dysenteriae* haem transport locus and its phylogenetic distribution in enteric bacteria. *Molecular microbiology*, *28*(6), 1139–52.
- Yamamoto, S., Tsukamoto, T., Terai, A., Kurazono, H., Takeda, Y., & Yoshida, O. (1997). Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. *The Journal of urology*, *157*(3), 1127–9.
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *53*(12), 5046–54.
- Zhang, L., Foxman, B., & Marrs, C. (2002). Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *Journal of clinical microbiology*, *40*(11), 3951–5.

Anexos

Anexo 1- Esquema de classificação de β -lactamases segundo dois autores (adaptado de www.medscape.com).

Classificação	β -lactamases	Aminoácido	Exemplos	Inibidores
Ambler				
A	Penicilinas	Serina	TEM-1, SHV, KPC, CTX-M, SME-1	Ácido clavulânico
B	Metalo- β -lactamases	Zinco	IMP1,, VIM-1	EDTA
C	Cefalosporinas	Serina	AmpC	-
D	Oxacilinas	Serina	OXA-1	Cloreto de sódio
Bush-Jacoby-Medeiros				
1	Cefalosporinas		AmpC	
2a	Penicilinas		PC1	
2b	Penicilinas de largo espectro		TEM-1, SHV-1	
2be	β -lactamases de largo espectro (ESBL)		TEM-10, SHV-2, CTX-M-type	
2br	Resistentes a inibidores		TEMs, IRTs, TEM-30,31	
2c	Hidrolizam Carbenicilina		PSE-1	
2d	Hidrolizam Oxacilina		OXA-1 to 11, PSE-2	
2e	Cefalosporinas		FEC-1	
2f	Carbapenemases		KPC-1, KPC-2, SME-1	
3	Metalo- β -lactamases		IMP-1, VIM-1, SPM-1	
4	Outros			

Anexo 2 – Exemplos de β -lactamases e sua distribuição segundo o grupo funcional. Número de variantes de enzimas descritas até 2010 (adaptado de Karen Bush & Jacoby, 2010).

Família Enzimática	Grupo ou subgrupo funcional	Nº de enzimas	Enzimas representativas
CMY	1, 1e	50	CMY-1 a CMY-50
TEM	2b, 2be, 2br, 2ber	172	
	2b	12	TEM-1, TEM-2, TEM-13
	2be	79	TEM-3, TEM-10, TEM-26
	2br	36	TEM-30 (IRT-2), TEM-31 (IRT-1), TEM-163
	2ber	9	TEM-50 (CMT-1), TEM-158 (CMT-9)
SHV	2b, 2be, 2br	127	
	2b	30	SHV-1, SHV-11, SHV-89
	2be	37	SHV-2, SHV-3, SHV-115
	2br	5	SHV-10, SHV-72
CTX-M	2be	90	CTX-M1, CTX-M-44 (Toho-1) até CTX-M-92
PER	2be	5	PER-1 a PER-5
VEB	2be	7	VEB-1 a VEB-7
GES	2f	15	GES-2 a GES-7 (IBC.1) a GES-15
KPC	2f	9	KPC-2 a KPC-10
SME	2f	3	SME-1, SME-2, SME-3
OXA	2d,2de, 2df	158	
	2d	5	OXA-1, OXA-2, OXA-10
	2de	9	OXA-11, OXA-14, OXA-15
	2df	48	OXA-23 (ARI-1), OXA-51, OXA-58
IMP	3a	26	IMP-1 a IMP-26
VIM	3a	23	VIM-1 a VIM-23
IND	3a	8	IND-1, IND-2, IND-2 ^a , IND-3 a IND-7