

JULIANA CARMO DE SOUZA

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS
DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE AVES SILVESTRES
RESGATADAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
NOVEMBRO / 2017

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Beatriz Meurer Moreira e coorientação de Alice Aurora Batalha de Jesus.

S719r Souza, Juliana Carmo de
Resistência a antimicrobianos em amostras de
"Escherichia coli" isoladas de aves silvestres
resgatadas no Estado do Rio de Janeiro / Juliana
Carmo de Souza. -- Rio de Janeiro, 2017.
55 f.

Orientador: Beatriz Meurer Moreira.
Coorientador: Alice Aurora Batalha de Jesus.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2017.

1. "Escherichia coli". 2. Aves silvestres. 3.
Resistência a antimicrobianos. 4. ESBL. I. Moreira,
Beatriz Meurer, orient. II. Jesus, Alice Aurora
Batalha de, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre iluminou meus caminhos e me abençoou com tantas graças e vitórias.

Aos meus pais, que me criaram com todo o amor do mundo, me ensinaram a ser quem eu sou e me apoiaram em todas as minhas escolhas.

Às minhas irmãs, que sempre me inspiraram e me incentivaram a chegar até aqui.

Ao Davi, que esteve o tempo todo ao meu lado, nos bons e maus momentos. Muito obrigada por toda a ajuda, força, carinho, suporte e por não me deixar desistir. As minhas conquistas não se tornariam tão importantes sem a sua presença.

A toda a minha família, que sempre acompanhou os meus passos e me instruiu a ser cada vez mais dedicada, responsável e perseverante.

À Melody, que preenche a minha vida com tanta ternura, oferecendo o seu carinho e a sua companhia durante as minhas horas diárias de estudos. Obrigada por me ensinar a ver a vida ao seu modo, simples e cheio de amor.

Aos presentes que a UFRJ me deu: Iva, Julia, Victor, Thiago, Larissa, Isabella e Fernanda. A amizade de vocês foi uma das coisas mais incríveis que eu pude conquistar. Muito obrigada por tudo: apoio, conversas, passeios, brincadeiras, descontrações, risadas, choros, desesperos, estudos em grupo, abraços coletivos e, principalmente, pela cumplicidade. Esses 4 anos não seriam os mesmos sem vocês.

Aos meus colegas de graduação. A turma mais unida que eu tive em todos os meus anos de estudos.

À Professora Beatriz Meurer Moreira, por ter contribuído da melhor forma possível com todo o seu conhecimento e sabedoria, e por ter confiado em mim desde o início.

À minha coorientadora Alice Batalha, pela sua paciência, confiança, dedicação, amizade e carinho. Sua presença foi essencial para que eu chegasse até aqui. Muito obrigada por tudo.

À Andréa Freitas e à professora Lúcia Teixeira, pela grande parceria neste trabalho. Muito obrigada por toda a colaboração e apoio.

Aos professores Sérgio Fracalanza, Raquel Bonelli e Renata Picão, e aos colegas do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica. Foram três anos de muito aprendizado, apoio e carinho.

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes e a todos os membros que o transformaram em uma grande família.

À PIBIC – CNPq, pelo auxílio financeiro que permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.”

(Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

JULIANA CARMO DE SOUZA

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE AVES SILVESTRES RESGATADAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Orientador: Beatriz Meurer Moreira

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O tratamento antimicrobiano sofreu forte impacto com a emergência de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases, enzimas que ocorrem em amostras de *Escherichia coli*, entre outras enterobactérias, conferindo resistência. Também de impacto tem sido a rápida difusão de genes que tornam espécies bacterianas resistentes a cefalosporinas e cefamicinas (β -lactamases do tipo AmpC plasmidial, ou pAmpC) e com susceptibilidade diminuída a fluorquinolonas (*qnr*, *qepA* e *aac(6')-Ib-cr*). Esta se torna uma questão de urgência no que diz respeito às infecções relacionadas com a assistência à saúde. Alguns animais silvestres, incluindo a aves silvestres, foram identificados como reservatórios de amostras de *E. coli* resistentes a antimicrobianos por sua facilidade em carrear microrganismos através de seu deslocamento. O objetivo do presente estudo foi rastrear a produção de ESBL, carbapenemases e a presença dos genes dos grupos *qnr*, *qepA*, *aac(6')-Ib-cr* e pAmpC em amostras de *E. coli* isoladas de aves silvestres resgatadas por centros de recuperação do Estado do Rio de Janeiro. Amostras de *E. coli* obtidas do trato gastrointestinal das aves foram isoladas a partir da coleta de swab da cloaca. Foi realizada a semeadura nos meios de ágar MacConkey, ágar MacConkey contendo ceftriaxona (1,5 $\mu\text{g/mL}$) e caldo tripton de soja (9,95 mL) contendo disco de ertapenem (10 μg). As colônias isoladas foram identificadas por espectrometria de massas (MALDI-TOF) e armazenadas em suspensão com leite desnatado (0,1 g/mL) e glicerol (0,1 mL para cada mL de solução). A susceptibilidade das amostras foi determinada em testes de disco-difusão para os antimicrobianos, amicacina, ampicilina, cefoxitina, ceftriaxona, cefuroxima, ciprofloxacina, ertapenem, gentamicina, imipenem, nitrofurantoína e sulfametoxazol/trimetoprim. A produção de ESBL foi verificada em teste de dupla-difusão com discos de amoxicilina/ácido clavulânico, aztreonam, cefepime, cefotaxima e ceftazidima. A partir de 17 espécies de aves silvestres, foram armazenadas 353 amostras de *E. coli*, sendo 117 (33%) multirresistentes. Destas, 41 eram produtoras de ESBL, todas do tipo CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-15), o que foi determinado através de reações de PCR e da técnica de sequenciamento. Os genes *qnrB* e *aac(6')-Ib* foram detectados em 31 e 13 amostras, respectivamente. Também através do sequenciamento, foi verificada a presença da variante *aac(6')-Ib-cr* em 9 amostras e a presença do gene *bla_{CMY-2}*, da família CIT, pertencente ao pAmpC, em 6 amostras. Não foi detectada a presença de carbapenemases e do gene *qepA*. Estes resultados mostram a circulação e disseminação da contaminação ambiental por bactérias resistentes no Rio de Janeiro, afetando aves silvestres.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, aves silvestres, resistência a antimicrobianos, ESBL.

ABSTRACT

JULIANA CARMO DE SOUZA

ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN SAMPLES OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM WILD BIRDS RESCUED IN RIO DE JANEIRO STATE

Orientador: Beatriz Meurer Moreira

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Antimicrobial treatment underwent a strong impact with the emergency of extended spectrum β -lactamases (ESBL) and carbapenemase enzymes, which occur in *Escherichia coli* isolates and other enterobacteria and confer resistance. In addition, the rapid spread of genes mediating resistance to cephalosporins, cefamycins, plasmid mediated AmpC β -lactamases (pAmpC), and reduced susceptibility to fluoroquinolones (*qnr*, *qepA* e *aac(6')-Ib-cr*) had also a strong impact. This is an urgent problem specially for healthcare associated infections. Some wild animals, including wild birds, have been identified as reservoirs of antimicrobial resistant *E. coli* isolates. These birds may carry organisms during migration. The aim of the present study was to screen for the production of ESBL, carbapenemases and the presence of *qnr*, *qepA*, *aac(6')-Ib-cr* and pAmpC genes in *E. coli* isolates from wild birds rescued from centers in Rio de Janeiro State. *E. coli* isolates from birds' gastrointestinal tract were obtained from cloacal swabs. Samples were plated onto MacConkey agar, MacConkey agar containing ceftriaxone (1.5 μ g/ml) and tryptone soy broth (9,95 mL) containing ertapenem disc (10 μ g). Isolated colonies were identified by mass spectrometry (MALDI-TOF) and stored as suspensions in skim milk (0.1 g/mL) and glycerol (0.1 mL for each mL solution). Susceptibility was determined in disc-diffusion tests for the antimicrobials amikacin, ampicillin, cefoxitin, ceftriaxone, cefuroxime, ciprofloxacin, ertapenem, gentamicin, imipenem, nitrofurantoin, and sulfamethoxazole/trimethoprim. ESBL production was assessed in a double diffusion test with amoxicillin/clavulanic acid, aztreonam, cefepime, cefotaxime, and ceftazidime discs. From 17 wild birds, 353 *E. coli* isolates were saved, and 117 (33%) were multidrug-resistant. Of these isolates, 41 were ESBL producers, all of CTX-M type (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 and CTX-M-15), as determined by PCR and sequencing. The *qnrB* and *aac(6')-Ib* genes were detected in 31 and 13 isolates, respectively. The *aac(6')-Ib-cr* gene was detected among 9 isolates, and the pAmpC *bla*_{CMY-2} gene, of the CIT family, in 6 isolates. Carbapenemase production and the *qepA* gene were not detected. These results show the circulation and dissemination of environmental contamination by resistant bacteria in Rio de Janeiro, affecting wild birds.

Key-words: *Escherichia coli*, wild birds, antimicrobial resistance, ESBL.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Escherichia coli</i>	1
1.1.1 Identificação	2
1.1.2 Resistência a antimicrobianos	3
1.1.3 As β -lactamases	4
1.1.4 β -lactamases de espectro estendido do tipo CTX-M	5
1.1.5 β -lactamases do tipo AmpC	5
1.1.6 Resistência a quinolonas mediada por plasmídios	6
1.2 O problema da resistência aos antimicrobianos no meio ambiente	7
1.3 O papel das aves na disseminação da resistência	8
2 JUSTIFICATIVA	10
3 OBJETIVOS	11
4 MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Coleção de amostras de <i>Escherichia coli</i>	12
4.2 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos e de produção de ESBL	17
4.3 Critérios para definição de amostra suspeita da produção de ESBL e carbapenemases	18
4.4 Critérios para a classificação de amostras como multirresistentes a antimicrobianos.	19
4.5 Pesquisa de genes que codificam a produção de ESBL do tipo CTX-M, β -lactamase do tipo AmpC plasmidial e genes <i>qnr</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> e <i>qepA</i>	20
4.6 Análises estatísticas	24
5 RESULTADOS	25
5.1 Coleção de amostras de <i>E. coli</i>	25
5.2 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos e de produção de ESBL	26
5.3 Detecção dos genes <i>bla</i> _{CTX-M}	31
5.4 Detecção dos genes que codificam a β -lactamase do tipo pAmpC	31
5.5 Detecção dos genes <i>qnr</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> e <i>qepA</i>	31
5.6 Investigação da relação entre a presença dos genes <i>aac(6')-Ib-cr</i> e <i>qnrB</i> e a produção de ESBL	32
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÕES	38
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* pertence à família *Enterobacteriaceae* sendo composto atualmente por 8 espécies bacterianas: *E. adecarboxylata*, *E. albertii*, *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. marmotae* e *E. vulneris* (Euzéby, 2017). São bacilos gram-negativos, móveis por flagelos peritríqueos ou imóveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos, oxidase negativos e quimiorganotróficos (Migula, 1895 *apud* Scheutz e Strockbine, 2005; Castellani e Chalmers, 1919).

E. coli é a espécie tipo do gênero. Entre as características fenotípicas estão a fermentação da lactose e da glicose com produção de gás, motilidade, anaerobiose facultativa e produção de indol. É encontrada na microbiota do trato intestinal de humanos e animais vertebrados. A maioria das estirpes não é patogênica e a probabilidade da detecção deste gênero bacteriano aumenta de acordo com a massa corporal de aves e mamíferos e com a morfologia de seu trato intestinal (Gordon e Cowling, 2003). Outros fatores do hospedeiro também determinam o aumento da densidade das células de *E. coli*, como o ganho de peso durante a gravidez (Santacruz *et al.*, 2010) ou o baixo peso em crianças (Monira *et al.*, 2011). Além disso, esta bactéria é mais frequentemente encontrada em animais que vivem em associação com humanos do que aqueles que habitam ambientes naturais sem alteração ou influência humana (Gordon e Cowling, 2003). Porém, estudos utilizam amostras de espécimes fecais que permitem a detecção de apenas 5% da população de *E. coli* presente no hospedeiro (Gordon, Bauer e Johnson, 2002), ou seja, a amostragem analisada em grande parte das pesquisas pode não representar a verdadeira variedade de genótipos existentes da bactéria.

Esta espécie bacteriana, por ser constantemente eliminada nas fezes, pode ser mantida na população mesmo na ausência de outros hospedeiros devido a baixos níveis de desenvolvimento e de saneamento básico e pela falta de água tratada na comunidade (Besser, Davis e Walk, 2011). Por este motivo, a bactéria é utilizada na saúde pública como indicador de contaminação fecal de água e alimentos. Porém, apesar de a maioria estar presente no trato intestinal de humanos e animais como comensais, alguns clones patogênicos podem se estabelecer e causar doenças. A patogênese de *E. coli*, inclusive em indivíduos aparentemente saudáveis, pode ser atribuída à expressão de fatores específicos de virulência, e em hospedeiros imunocomprometidos, a bactéria pode atuar como patógeno oportunista (Kaper, Nataro e Mobley, 2004).

No grupo das cepas de *E. coli* patogênicas intestinais (IPEC) estão incluídos os seguintes subgrupos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* aderente-invasiva (AIEC) (Nataro e Kaper, 1998; Kaper, Nataro e Mobley, 2004; Croxen *et al.*, 2013). Além disso, outro grupo de bactérias denominadas como *E. coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC) podem causar doenças em tecidos não-intestinais, cujos subgrupos são: *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC), *E. coli* associada à sepse (SEPEC) (Pitout, 2012; Leimbach, Hacker e Dobrindt, 2013) e *E. coli* patogênica aviária (APEC) (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999).

1.1.1 Identificação

Amostras de *E. coli* podem ser identificadas e diferenciadas de outras espécies do gênero através de testes bioquímicos cujos meios de cultura são preparados em laboratório, substratos cromogênicos ou kits comerciais de identificação, além de métodos automatizados (ANVISA, 2004).

Os testes bioquímicos detectam produtos do metabolismo bacteriano, como, por exemplo, a fermentação da lactose e a produção de gás e indol. Entre os testes, estão a utilização do meio IAL (Instituto Adolfo Lutz), elaborado para a triagem e identificação dos principais gêneros de enterobactérias, o meio TSI (tríplice açúcar ferro), que detecta a fermentação de açúcares, a produção de gás e a produção de sulfeto de hidrogênio, e as provas de motilidade, de produção de indol e oxidase. Meios de cultura como o MacConkey, seletivo para enterobactérias e indicador para a fermentação de lactose, podem ser usados para facilitar o isolamento de *E. coli* (ANVISA, 2004).

Pode ser utilizado também o Sistema API para *Enterobacteriaceae*, em que a identificação é feita através do perfil formado com a modificação visível das colorações dos distintos substratos dispostos no sistema, como manitol, inositol, citrato, produção de indol e fermentação da glicose (Smith *et al.*, 1972).

A técnica de espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo (MALDI-TOF) é uma alternativa aos testes bioquímicos e tem sido adotada para a identificação das espécies em laboratórios clínicos e de pesquisa científica,

com bom desempenho na diferenciação das espécies de *Escherichia* (He *et al.*, 2010; Dubois *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2012; Clark *et al.*, 2013).

Testes sorológicos para a identificação de IPEC são utilizados em diagnósticos de interesse epidemiológico, por causarem infecções em maior número de ocorrências. Nestes testes são medidas as interações entre anticorpos séricos e o LPS para detectar a infecção por estas cepas patogênicas intestinais, principalmente por sorotipos mais frequentes (Nataro e Kaper, 1998).

Espécies do gênero *Shigella* são fenotipicamente semelhantes a espécies do gênero *Escherichia*. Estudos filogenéticos mostram que 13 cepas de *S. boydii* se agrupam em uma árvore próxima à *E. albertii* (Hyma *et al.*, 2005). Além disso, relações entre espécies dos dois gêneros foram descritas por estudos de reassociação de DNA, como, por exemplo, os antígenos O de ambos, que podem ser muito semelhantes ou indistinguíveis (Brenner *et al.*, 1972). No entanto, outros estudos observaram que o gênero *Shigella* é bioquimicamente menos ativo que *E. coli* e compartilha, de forma indistinguível, genes de patogenicidade apenas com cepas EIEC. Sendo assim, atualmente, além da realização de testes bioquímicos e sorológicos tradicionais, as técnicas de sequenciamento de genoma completo também são realizadas para a tipagem destas bactérias (van den Beld e Reubsæet, 2012).

1.1.2 Resistência a antimicrobianos

Assim como outras bactérias gram-negativas, *E. coli* possui resistência intrínseca a antimicrobianos hidrofóbicos, como macrolídeos, rifamicinas e novobiocina. A incompatibilidade destes antimicrobianos com a estrutura da membrana externa bacteriana e a presença de bombas de efluxo ativas contribuem para esta resistência (Nikaido, 1996).

A resistência adquirida a outros antimicrobianos como β -lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfonamidas, cloranfenicol, macrolídeos, tetraciclina e trimetoprim pode ocorrer por mecanismos distintos: alteração do local do alvo do antimicrobiano, modificação enzimática ou diminuição da acumulação do antimicrobiano, através de mutações cromossômicas ou da aquisição de plasmídios carreadores de genes de resistência responsáveis por estes mecanismos, ou ainda, através da transferência horizontal de genes de resistência responsáveis pela produção de enzimas, que são carreados em plasmídios ou transpósons (Quintiliani e Courvalin, 1995 *apud* Scheutz e Strockbine, 2005).

1.1.3 As β -lactamases

Estas enzimas hidrolisam os agentes β -lactâmicos e estão amplamente difundidas em diversas espécies bacterianas (Ambler, 1980). De acordo com Sanders e Sanders (1992), em Gram-negativos, a produção de β -lactamases é o mecanismo de resistência mais importante contra os antimicrobianos desta classe.

As β -lactamases possuem duas classificações distintas: serino- β -lactamases, que possuem uma serina em seu sítio ativo e se associam ao antimicrobiano, quebrando o anel β -lactâmico, e metalo- β -lactamases, que causam uma ruptura no anel através da utilização de íons de zinco (Livermore, 1995).

Muitos β -lactâmicos foram desenvolvidos especificamente para resistir à ação hidrolítica das enzimas, porém, com o uso intenso destes antimicrobianos, novas β -lactamases emergiram, conferindo resistência inclusive a β -lactâmicos com elevado espectro de ação (Bradford, 2001). Estas enzimas, denominadas β -lactamases de espectro estendido (ESBL), são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração e o aztreonam. A sua atividade hidrolítica é bloqueada apenas pelos agentes inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico (Paterson e Bonomo, 2005). Entre as principais famílias de ESBL, estão: TEM, SHV, OXA e CTX-M (Dalmarco, Blatt e Córdova, 2006).

Cepas de *E. coli* produtoras de enzimas β -lactamases do tipo AmpC e de ESBL do tipo CTX-M têm sido encontradas como importantes causas de infecções extraintestinais em um nível global (Banerjee *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2013). Em 2014, um clone pandêmico de *E. coli* multirresistente (ST131) produtor de ESBL do tipo CTX-M-15 e com susceptibilidade diminuída a fluorquinolonas foi isolado em pacientes idosos hospitalizados com infecção urinária e bacteremia, adquiridas na comunidade (Banerjee *et al.*, 2013).

Entre as β -lactamases que conferem resistência a carbapenemas, a Carbapenemase de *Klebsiella pneumoniae* (KPC) é uma das mais encontradas em *E. coli*. Os antimicrobianos incluídos nesta classe são as opções escolhidas para tratamento em casos de infecções por cepas produtoras de ESBL. Portanto, a detecção de bactérias produtoras de KPC em pacientes é de grande importância para que ações de isolamento destes indivíduos infectados por estas cepas sejam realizadas, a fim de impedir a disseminação da resistência a carbapenemas no ambiente hospitalar ou na comunidade, caso a infecção não seja tratada de forma adequada (Anderson *et al.*, 2007).

1.1.4 β -lactamase de espectro estendido do tipo CTX-M

CTX-M é uma família de ESBL mediada por plasmídeo e hidrolisa preferencialmente a cefotaxima, uma cefalosporina de terceira geração. São descritas em *E. coli* e em outras espécies de *Enterobacteriaceae*. Estas β -lactamases possuem 5 subclassificações a partir da similaridade da sequência de seus aminoácidos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (Bonnet *et al.*, 2000). Estas subclassificações podem ainda ser divididas em diversos grupos. Ademais, já foi demonstrado que o resíduo de serina na posição 237, presente em todas as CTX-M, possui um papel importante na atividade de espectro estendido das enzimas (Tzouveleki *et al.*, 2000).

Genes que codificam estas enzimas são encontrados em plasmídios que transportam também genes de outras ESBL, como TEM, OXA e SHV (Sabaté *et al.*, 2000; Karim *et al.*, 2001). Além destes, podem ser detectados também genes de resistência a aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfonamida, trimetoprim e tetraciclina. Ou seja, a aquisição destes plasmídios por cepas de *E. coli* resulta em uma possível multirresistência.

Cepas carreadoras de CTX-M são isoladas em todo o mundo. Ao se difundirem pela comunidade, podem provocar surtos com difícil controle, principalmente em populações com resposta imune comprometida, causando casos graves de infecções intestinais e extraintestinais.

1.1.5 β -lactamases do tipo AmpC

Estas β -lactamases, cromossômicas ou plasmidiais, conferem resistência à maioria das penicilinas, cefalotina, cefazolina, cefoxitina e inibidores de β -lactamases por meio da hidrólise destes antimicrobianos. Diferenças na sequência de aminoácidos geraram diferentes famílias de β -lactamases do tipo AmpC: CMY, FOX, ACC, LAT, MIR, ACT, MOX e DHA (Lahey Clinic, 2017).

Genes que codificam β -lactamases do tipo AmpC transportados por plasmídios são encontrados em *Enterobacteriaceae* de todo o mundo, isolados a partir de amostras hospitalares ou comunitárias, desde 1989 (Philippon, Arlet e Jacoby, 2002; Walther-Rasmussen e Høiby, 2002).

Cepas de *E. coli* produtoras de AmpC cromossômica em elevados níveis, ou seja, com mais de um sítio de mutação, já foram identificadas em espécimes clínicos, apesar da baixa

expressão ser relatada para a espécie (Bergstrom e Normark, 1979; Olsson, Bergström e Normark, 1982; Olsson *et al.*, 1983; Caroff *et al.*, 1999; Caroff *et al.*, 2000; Forward *et al.*, 2001; Siu *et al.*, 2003). Além disso, a perda de porinas da membrana externa pode aumentar ainda mais o fenótipo de resistência nestas cepas, aumentando os índices de resistência contra carbapenemas (Mammeri *et al.*, 2008).

1.1.6 Resistência a quinolonas mediada por plasmídios

Fluorquinolonas são antimicrobianos utilizados em infecções do trato urinário, entre outras indicações. A aquisição de mutações em genes que codificam a DNA girase e a topoisomerase IV bacterianas confere um fenótipo de alto nível de resistência a esta classe de antimicrobianos (Weigel, Steward e Tenover, 1998; Komp Lindgren, Karlsson e Hughes, 2003; Robicsek *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2009). Porém, além desta resistência cromossômica, há também a resistência plasmidial.

Qnr é uma proteína codificada por um grupo de genes de transmissão horizontal mediada por plasmídios. Desde a sua descoberta, em 1998 (Martínez-Martínez, Pascual e Jacoby, 1998), estes genes tiveram uma distribuição global em diversos ambientes e espécies bacterianas. Este grupo de genes codifica a resistência através da proteção da DNA girase bacteriana (Jacoby *et al.*, 2009).

Até recentemente, seis famílias de genes *qnr* haviam sido descritas: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* e *qnrVC*. Plasmídios que transportam estes genes podem conferir à bactéria o fenótipo *low-level quinolone resistance* (LLQR) (Strahilevitz *et al.*, 2009; Varela *et al.*, 2015) e estão frequentemente associados a genes que codificam ESBL e a genes que codificam resistência a aminoglicosídeos (Carattoli, 2009), aumentando ainda mais a gravidade da disseminação destes plasmídios. Em 2017 foi descrita uma nova família de genes *qnr* isolada em uma amostra clínica de *K. pneumoniae*, sendo o gene denominado de *qnrE1*, originado de espécies de *Enterobacter* (Albornoz *et al.*, 2017). Esquemas de reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex desenvolvidos para detectar genes *qnr* ainda não incluem a variante *qnrE1*.

Além disso, há outros dois mecanismos adicionais de susceptibilidade diminuída transferível às fluorquinolonas: a redução da atividade da ciprofloxacina através da acetiltransferase AAC(6')-Ib-cr (Robicsek *et al.*, 2006), e a extrusão de fluorquinolonas por

bombas de efluxo através da proteína QepA (Périchon, Courvalin e Galimand, 2007; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011).

O gene *aac(6')-Ib-cr* é uma variante da acetiltransferase AAC(6')-Ib, que confere resistência a tobramicina, amicacina e canamicina. Esta variante é responsável pela acetilação do grupo amina piperazinila presente na estrutura química da ciprofloxacina (Robicsek *et al.*, 2006). De acordo com estudos de Strahilevitz *et al.* (2009), este alelo possui dois códons distintos, Trp102Arg e Asp179Tyr, em comparação a outras variantes do gene *aac(6')-Ib*, o que foi considerado pelos pesquisadores o suficiente para a expressão do fenótipo de resistência à ciprofloxacina.

O gene *qepA* codifica uma proteína de 511 aminoácidos pertencente a uma família de transportadores transmembranares, atuando como bomba de efluxo (Strahilevitz *et al.*, 2009). Esta proteína possui uma variante, QepA2, que possui duas substituições de aminoácidos e confere um fenótipo semelhante à determinante QepA, ou QepA1 (Cattoir, Poirel e Nordmann, 2008).

1.2 O problema da resistência aos antimicrobianos no meio ambiente

Bactérias carreadoras de genes de resistência a antimicrobianos se disseminam mundialmente, infectando seres humanos e animais ao mesmo tempo em que estabelecem reservatórios no meio ambiente e, com isso, estas cepas se tornam importantes ameaças de prejuízos a longo prazo para a saúde pública (Weiman, 2016).

Animais selvagens fornecem também um mecanismo de propagação de bactérias resistentes. O isolamento de cepas resistentes de *E. coli* e de *Enterococcus* spp. provenientes de espécies selvagens foi relatado pela primeira vez em aves japonesas (Sato *et al.*, 1978) e, alguns anos mais tarde, esta detecção foi feita também em macacos babuínos (Rolland *et al.*, 1985).

Diversas espécies são importantes na medicina veterinária e humana e na comunidade, porém, espécies de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) e *E. coli* produtoras de ESBL são consideradas patógenos indicadores para o rastreamento da evolução das bactérias multirresistentes na vida selvagem e no ambiente (Radhouani *et al.*, 2014). Outros patógenos humanos, incluindo *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemas (CRE) e *Staphylococcus*

aureus resistentes à meticilina (MRSA) são adaptáveis a diversos hospedeiros e circulam entre diversos animais e humanos.

A vida selvagem pode adquirir bactérias resistentes através do contato com humanos e de água poluída por contaminação fecal (Martinez, 2009), além do uso destes agentes na medicina veterinária. A disseminação dessas cepas pode ocorrer também através de ambientes distintos, como o solo, lençóis freáticos, pecuária, alimentos, lixos hospitalares, aves selvagens e animais de estimação.

No Rio de Janeiro, a presença de enterobactérias, incluindo *Kuyvera* sp, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter* sp, *Enterobacter* sp, produtoras de carbapenemases dos tipos KPC e GES (Montezzi *et al.*, 2015), e *K. pneumoniae* produtora de NDM foi recentemente observada em praias do Rio de Janeiro (Campana *et al.*, 2016b) e em águas da Lagoa Rodrigo de Freitas e do Rio Carioca (de Araújo *et al.*, 2016).

Genes de resistência também já foram detectados em alimentos na mesma cidade. Os genes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-8} foram detectados em 45 de 136 amostras de *E. coli* isoladas de quatro diferentes produtores de frango brasileiros adquiridos em mercados no Rio de Janeiro (Botelho *et al.*, 2015). Várias amostras também carregavam *bla*_{CMY-2} concomitantemente a *bla*_{CTX-M-2} ou *bla*_{CTX-M-8}. Os genes *qnrB* e *qnrS* foram encontrados em combinação com todas as β -lactamases detectadas. A maior parte desses elementos foi transferível em experimentos de conjugação indicando sua presença em plasmídios conjugativos. Esses achados evidenciaram que genes que codificam ESBL e β -lactamases do tipo AmpC estão distribuídos na carne de frango brasileira.

1.3 O papel das aves na disseminação da resistência

Aves silvestres, principalmente espécies migratórias de longas distâncias, têm o potencial de contribuir na disseminação de cepas bacterianas resistentes a antimicrobianos que, por sua vez, podem atingir a população humana (Madec *et al.*, 2017). Alguns patógenos podem ser encontrados com maior frequência em aves silvestres do que em outras espécies de animais (Peterson, Vieglais e Andreasen, 2003; Rappole e Hubalek, 2003). Com isso, o potencial de disseminação destas cepas por aves pode ser considerado um problema de saúde pública (Rappole e Hubalek, 2003; Qiu, 2005).

Os índices de resistência encontrado em animais silvestres, como as aves, parece estar ligado à associação que estes têm apresentado com a atividade humana (Skurnik *et al.*, 2006; Allen *et al.*, 2010), porém, de acordo com Hernandez *et al.* (2010), alguns estudos já demonstraram a presença de cepas resistentes nestes animais em áreas de preservação. Tais achados ressaltam ainda mais a complexidade da disseminação da resistência. Isso sugere que a migração das aves para locais remotos e a presença humana em diversos nichos, inclusive ecológicos, influenciam na propagação de genes de resistência a antimicrobianos (Guenther, Ewers e Wieler, 2011).

Um estudo também já mostrou a presença de cepas de *E. coli* resistentes a múltiplas drogas em 123 aves silvestres internadas em um hospital veterinário de São Paulo. Estas cepas foram encontradas em 47% das amostras coletadas e, com isso, estas aves de vida livre demonstram ser reservatórios e, conseqüentemente, disseminadoras de microrganismos com o potencial de causar doenças, sendo de grande relevância para a saúde pública e outras espécies animais (Borges, 2016).

A presença de cepas de *E. coli* com resistência a cefalosporinas e com susceptibilidade diminuída a fluorquinolonas, mediadas por plasmídios, também já foi demonstrada. Estas bactérias foram coletadas em amostras fecais de corvos de oito países da Europa. Dentre as 1.073 amostras de *E. coli* isoladas, 152 (14%) eram resistentes a cefotaxima, sendo os genes predominantes aqueles que codificavam β -lactamases do grupo CTX-M (CTX-M-1 e CTX-M-15). Dentre estas 152 amostras, 31% carregavam também o gene que codifica β -lactamase do tipo pAmpC (CMY-2). Além disso, em 355 (33%) amostras fecais foi encontrada *E. coli* com susceptibilidade reduzida a ciprofloxacina, que carregava o gene *qnrS*. Tais descobertas na vida selvagem refletem, possivelmente, procedimentos inadequados de eliminação de resíduos que, uma vez no ambiente, atingem as fontes de alimentação e água utilizadas por aves como os corvos (Jamborova *et al.*, 2015).

O tamanho do reservatório ambiental de genes de resistência ainda é pouco conhecido (Madec *et al.*, 2017), especialmente em animais selvagens. Um estudo voltado para aves que circulam no Estado do Rio de Janeiro seria de interesse para fornecer uma estimativa do montante do problema na população de amostras de *E. coli*.

2 JUSTIFICATIVA

E. coli é um microrganismo conhecido por sua habilidade em receber e transferir genes dentro da própria espécie e entre gêneros bacterianos distintos, para disseminação por diferentes ambientes ou com capacidade patogênica para diferentes órgãos do hospedeiro. Assim, mecanismos de transferência de genes nesta espécie ocorrem com frequência, envolvendo diversos organismos e conferindo grande importância no histórico de resistência bacteriana.

A transmissão de *E. coli* entre humanos e animais ocorre facilmente por estar associada à microbiota do trato intestinal, e o microrganismo se estabelece de forma natural em seus hospedeiros. Além disso, esta espécie bacteriana pode ser encontrada em diversos locais do ambiente, incluindo solo e água.

Com o passar dos anos, o ser humano passou a habitar e explorar regiões de ambientes mais preservados, de zonas de mata e reservas ecológicas, locais onde aves selvagens residem naturalmente. Estes animais também são frequentemente capturados e domesticados pelo homem, atitudes que aumentam o contato e as chances de um compartilhamento de bactérias resistentes entre ambos. Ademais, o deslocamento de aves para regiões urbanas também favorece esta troca, a partir da presença destes animais em locais onde há uso intenso de agentes antimicrobianos, descarte inadequado de lixo doméstico e hospitalar, e falta de saneamento básico. O deslocamento de retorno das aves ao seu habitat natural resulta na dispersão de bactérias possivelmente resistentes para estes ambientes, através das fezes. Desta forma, microrganismos circulam entre localizações distintas, contribuindo com a propagação de genes.

O presente estudo foi desenvolvido para investigar a presença de amostras de *E. coli* com fenótipos de resistência, e portadoras de genes que codificam resistência a antimicrobianos, em aves silvestres encaminhadas a centros de tratamento de animais selvagens no Rio de Janeiro. Algumas dessas aves são capazes de se deslocar a longas distâncias. O achado desses fenótipos e genes serviria de sentinela para indicar a disseminação ambiental de elementos que impõem um risco para a saúde da população do Estado do Rio de Janeiro, uma vez que a presença destes marcadores em infecções compromete a terapêutica antimicrobiana de humanos e animais.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo é descrever a presença de marcadores de resistência a antimicrobianos de importância clínica humana em amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves silvestres resgatadas por centros de recuperação de animais no Estado do Rio de Janeiro. Os objetivos específicos são: detectar a produção de ESBL, AmpC plasmidial e carbapenemases, a presença de genes que codificam estas β -lactamases, e susceptibilidade diminuída a fluorquinolonas mediada por genes *qnr*, pela acetiltransferase AAC(6')-Ib-cr e pela bomba de efluxo QepA nestas amostras.

O esquema experimental do estudo é:

- isolar amostras de *E. coli* de espécimes fecais de aves;
- verificar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e a produção de ESBL;
- selecionar amostras suspeitas da produção de ESBL e carbapenemases;
- detectar por ensaios de PCR a presença de genes que codificam ESBL do tipo CTX-M, AmpC plasmidial, carbapenemases, Qnr, QepA e AAC(6')-Ib;
- detectar a presença dos diferentes grupos de CTX-M, AmpC plasmidial e verificar a presença da variante AAC(6')-Ib-cr através da técnica de sequenciamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleção de amostras de *Escherichia coli*

Foram utilizados espécimes de 199 aves silvestres resgatadas e encaminhadas para três centros de recuperação de animais no Estado do Rio de Janeiro: Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS Brasil), do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA), Centro de Reabilitação de Animais Silvestres da Universidade Estácio de Sá (CRAS-UNESA) e Jardim Zoológico do Rio de Janeiro (RioZoo). Os dois primeiros centros têm como objetivo receber e tratar animais selvagens resgatados ou apreendidos por órgãos de fiscalização ambiental, ou em consequência de tráfico ilegal, caça, desmatamentos, queimadas ou vítimas de acidentes em geral. Já o zoológico tem como função manter os animais em cativeiro a fim de promover a reprodução e reduzir o risco de extinção, além de expor as espécies ao público para visitação, contribuindo para a educação ambiental da população.

A coleta do material foi realizada em todos os indivíduos da espécie *Amazona aestiva* (*Psittaciformes*) presentes no CETAS Brasil e no RioZoo, entre 2010 e 2013. Para as demais espécies de aves, pertencentes às ordens *Accipitriformes*, *Cathartiformes*, *Falconiformes* e *Strigiformes* (Tabela 1), foram amostrados indivíduos presentes no CETAS Brasil e no CRAS-UNESA, durante o ano de 2010. Nenhuma destas aves havia sido submetida a tratamento com antibioticoterapia. A partir destas aves, foram obtidos em estudos prévios, espécimes cloacais em swabs a fim de isolar amostras de *Escherichia coli* e montar uma coleção para a realização do presente estudo. Estes espécimes foram obtidos através da introdução de swabs estéreis, anteriormente imersos em solução salina, na cloaca das aves (cerca de 1,5 cm).

Tabela 1 – Relação de espécies de aves incluídas no estudo

Ordem taxonômica	Nome comum	Nome da espécie	Número de aves
<i>Accipitriformes</i>	Gavião Asa de Telha	<i>Parabuteo unicinctus</i>	3
	Gavião Carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	38
	Gavião Casaca de Couro	<i>Heterospizias meridionalis</i>	2
	Gavião de Cauda Branca	<i>Geranoaetus albicaudatus</i>	1
	Gavião de Cauda Curta	<i>Buteo brachyurus</i>	1
	Gavião Pombo Grande	<i>Pseudastur polionotus</i>	1
<i>Cathartiformes</i>	Urubu de Cabeça Preta	<i>Coragyps atratus</i>	10
<i>Falconiformes</i>	Carcará	<i>Carcara plancus</i>	16
	Carrapateiro	<i>Milvago chimachima</i>	1
	Falcão de Coleira	<i>Falco femoralis</i>	3
	Falcão Peregrino	<i>Falco peregrinus</i>	2
	Quiri-quiri	<i>Falco sparverius</i>	6
<i>Psittaciformes</i>	Papagaio Verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	86
<i>Strigiformes</i>	Coruja Orelhuda	<i>Asio clamator</i>	15
	Corujinha do Mato	<i>Megascops choliba</i>	10
	Coruja Preta	<i>Strix huhula</i>	1
	Murucututu	<i>Pulsatrix perspicilata</i>	3
Total			199

Os swabs contendo espécimes cloacais foram armazenados no meio leite desnatado (2%), triptona (3%), glicose (0,5%) e glicerol (10%) (STGG), em nitrogênio líquido. Estes swabs foram semeados em três condições: (1) Uma alíquota de 10µL de cada espécime foi semeada em placa contendo ágar MacConkey, para selecionar amostras de *E. coli* possivelmente sensíveis a antimicrobianos. (2) Outra alíquota de 10µL foi semeada em ágar MacConkey acrescido de ceftriaxona (1,5µg/mL), para selecionar possíveis produtoras de ESBL, e (3) 50µL foram inoculados em tubos contendo o caldo triptona de soja (TSB) (9,95 mL) acrescido de ZnSO₄ e contendo disco de ertapenem (10µg), para selecionar possíveis

produtoras de carbapenemases. Após incubação em estufa a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ em aerobiose durante 24h, os seguintes procedimentos, também descritos no esquema da Figura 1, foram adotados:

As colônias obtidas em ágar MacConkey foram observadas quanto aos aspectos morfológicos, e três daquelas suspeitas de *E. coli*, ou seja, de coloração rosa avermelhada, foram cultivadas por 24h em ágar tripton de soja (TSA). Uma colônia deste crescimento teve sua identificação confirmada através da tecnologia de espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo (MALDI-TOF). Bactérias identificadas como *E. coli* isoladas do meio MacConkey sem adição de antimicrobiano foram diretamente estocadas em criotubos contendo o meio Skim Milk (10%) acrescido de glicerol (10%) e armazenadas em congelamento.

Das amostras obtidas em ágar MacConkey com ceftriaxona, três colônias foram também cultivadas em TSA por 24h e tiveram sua identificação confirmada por MALDI-TOF. Em seguida, foram submetidas a teste de dupla-difusão para confirmar suspeita de produção de ESBL (Jarlier *et al.*, 1988). Neste teste, colônias de cada amostra obtidas no TSA foram diluídas em solução salina, de forma a obter turvação compatível com o padrão de 0,5 na escala McFarland. Este inóculo foi semeado com o auxílio de swabs estéreis de forma confluyente em ágar Müeller-Hinton, para a posterior aplicação de discos de aztreonam (30 μg), cefepime (30 μg), cefotaxima (30 μg), ceftazidima (30 μg) e um disco central de amoxicilina/ácido clavulânico. Quando houve distorção nos halos de inibição de qualquer β -lactâmico utilizado no teste em direção ao disco central indicando sinergismo, o resultado foi interpretado como positivo em relação à produção de ESBL e estas amostras foram estocadas em criotubos contendo Skim Milk e glicerol, sendo armazenadas em congelamento.

A cultura realizada em meio TSB contendo disco de ertapenem foi observada quanto à turvação após incubação em estufa a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 24h. Uma alíquota de 10 μL do meio em que houve turvação foi semeada em meio MacConkey e, após o mesmo período de incubação, três colônias suspeitas de *E. coli* foram cultivadas também por 24h em TSA. Uma colônia deste crescimento teve sua identificação confirmada através do MALDI-TOF e, sendo identificada como *E. coli*, outras colônias do mesmo crescimento foram submetidas a um teste de disco difusão em ágar Müeller-Hinton, com os carbapenemas ertapenem (10 μg) e imipenem (10 μg). A partir destas colônias, foram feitas suspensões em solução salina compatível com o padrão de turvação 0,5 da escala McFarland, e estas foram, com o auxílio de swabs estéreis, semeadas de forma confluyente no meio de cultura, com posterior aplicação

dos discos de antimicrobianos. As amostras que apresentaram halos de perfis intermediário e resistente foram estocadas em criotubos contendo Skim Milk (10%) e glicerol (10%) e armazenadas em congelamento.

Os limites dos halos foram interpretados conforme critérios de susceptibilidade propostos pelos Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015).

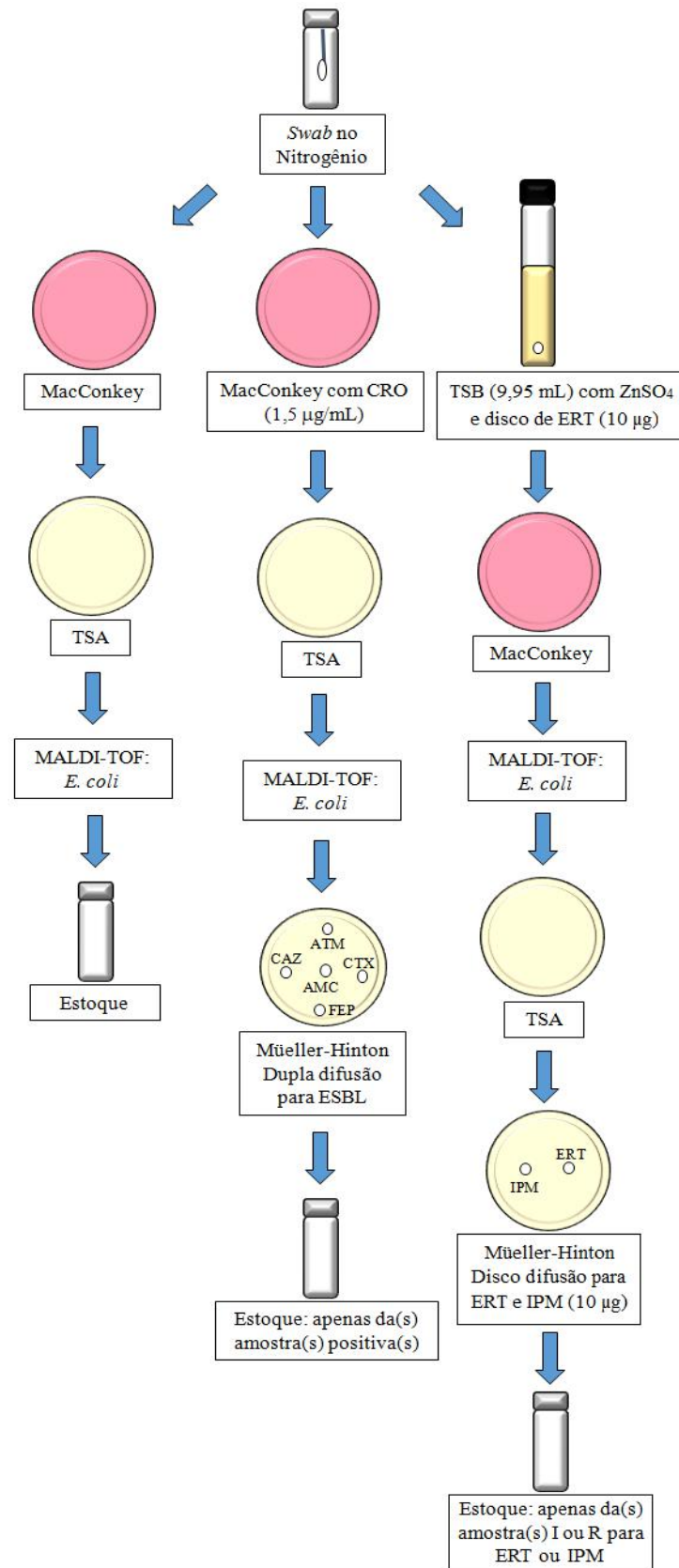


Figura 1 – Esquema da obtenção da coleção de amostras de *E. coli*. AMC: amoxicilina/ácido clavulânico ou ticarcilina/ácido clavulânico; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima; ERT: ertapenem; FEP: cefepime; IPM: imipenem. I: intermediário; R: resistente.

4.2 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos e de produção de ESBL

Todas as amostras estocadas foram investigadas quanto ao perfil fenotípico de susceptibilidade a antimicrobianos conforme recomendações do CLSI, e produção de ESBL conforme descrito por Jarlier *et al.* (1988). O teste realizado foi o de disco difusão em ágar, sendo aplicados discos de β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolona, sulfonamida e nitrofurano (como descrito na Tabela 2). Neste teste foram inclusos também os antimicrobianos utilizados no rastreamento inicial para a detecção da produção de ESBL, e os discos foram aplicados na disposição determinada para que fosse possível a visualização da distorção em casos de resultados positivos.

Para a realização do teste, amostras de *E. coli* previamente estocadas foram semeadas em TSA e incubadas a $35\pm 2^\circ\text{C}$, por 24h. Após esse cultivo, colônias foram diluídas em solução salina com o padrão de turvação compatível com 0,5 da escala McFarland e posteriormente semeadas em ágar Müeller-Hinton de forma confluyente através da utilização de swabs estéreis. Em seguida, foram aplicados no meio de cultura os discos de antimicrobianos descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Relação de antimicrobianos utilizados no teste de disco difusão em ágar

Classe	Antimicrobiano	Concentração (µg)
β-lactâmico	Amoxicilina/Ácido Clavulânico	30
	Ampicilina	10
	Aztreonam	30
	Cefepime	30
	Cefotaxima	30
	Cefoxitina	30
	Ceftazidima	30
	Ceftriaxona	30
	Cefuroxima	30
	Ertapenem	10
	Imipenem	10
Aminoglicosídeo	Amicacina	30
	Gentamicina	10
Fluorquinolona	Ciprofloxacina	5
Inibidor da síntese de ácido fólico	Sulfametoxazol/Trimetoprim	25
Nitrofurano	Nitrofurantoína	300

4.3 Critérios para definição de amostras suspeitas da produção de ESBL e de carbapenemase

Todas as amostras que apresentaram distorção do halo de inibição indicando sinergismo para cefalosporinas indicadoras, aztreonam e ácido clavulânico foram consideradas produtoras de ESBL e foram submetidas a testes moleculares para investigar a presença de genes que codificam β-lactamases do tipo CTX-M, conforme descrito no próximo item.

Amostras de *E. coli* com susceptibilidade intermediária ou diminuída a imipenem ou ertapenem no teste de susceptibilidade a antimicrobianos seriam submetidas ao teste CarbaNP descrito por Campana *et al.* (2016a), que consiste em um teste rápido para confirmar a produção de carbapenemases por diferentes espécies bacterianas, baseado na hidrólise do

antimicrobiano imipenem na presença e na ausência de EDTA e na modificação da coloração do meio a partir da mudança de pH decorrente desta hidrólise.

4.4 Critérios para a classificação de amostras como multirresistentes a antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi analisado para a classificação das amostras em multirresistentes (MR), ou seja, resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos, conforme recomendado (Magiorakos *et al.*, 2011). As classes consideradas estão descritas na Tabela 3. Amostras produtoras de ESBL também foram classificadas como MR.

Tabela 3 – Classes de antimicrobianos usadas na definição de bactérias MR (Magiorakos *et al.*, 2011)

Classes	Agentes antimicrobianos
Aminoglicosídeos	Gentamicina Amicacina
Penicilinas + inibidores de β -lactamases	Ticarcilina + ácido clavulânico
Carbapenemas	Ertapenem Imipenem
Cefalosporinas de 1 ^a e 2 ^a gerações	Cefuroxima
Cefalosporinas de 3 ^a e 4 ^a gerações	Cefotaxima Ceftriaxona Ceftazidima Cefepime
Cefamicinas	Cefoxitina
Fluorquinolona	Ciprofloxacina
Inibidor da síntese de ácido fólico	Sulfametoxazol-trimetoprim
Monobactâmico	Aztreonam
Penicilina	Ampicilina
Penicilinas + inibidores de β -lactamases	Amoxicilina + ácido clavulânico

4.5 Pesquisa de genes que codificam a produção de ESBL do tipo CTX-M, β -lactamase do tipo AmpC plasmidial e genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA*

As pesquisas dos genes *bla*_{CTX-M}, β -lactamase do tipo pAmpC e dos genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA* foram feitas em reação de PCR. Os protocolos utilizados foram aqueles descritos por Dallenne *et al.* (2010), Pérez-Pérez e Hanson (2002) e Park *et al.* (2006), Yamane *et al.* (2007) e Kraychete *et al.* (2016), respectivamente.

As reações de PCR foram realizadas a partir do DNA extraído de suspensões bacterianas compatíveis com o padrão de turvação 0,5 na escala McFarland, em água destilada, com colônias de amostras bacterianas crescidas em TSA, após incubação por 24h, a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Para a extração do DNA, as suspensões foram submetidas à agitação através de um aparelho de vórtex.

A detecção do gene *bla*_{CTX-M} foi feita em amostras bacterianas com teste positivo para a produção de ESBL. A reação (Tabela 4) foi feita com volume final de 25 μL , incluindo 4,5 μL de água bidestilada estéril, 12,5 μL de Master Mix, 1 μL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmol) e 2 μL da suspensão bacteriana.

Tabela 4 – Iniciadores utilizados para a detecção dos genes *bla*_{CTX-M}

Gene	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>bla</i> _{CTX-M1}	ctx-M1 F	TTAGGARTGTGCCGCTGTA	688
	ctx-M1 R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	
<i>bla</i> _{CTX-M2}	ctx-M2 F	CGTTAACGGCACGATGAC	404
	ctx-M2 R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	
<i>bla</i> _{CTX-M-8/25}	ctx-M8/25 F	AACACACAGACGCTCTAC	326
	ctx-M8/25 R	TCGAGCCGGAASGTGTYAT	
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	ctx-M9 F	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561
	ctx-M9 R	TGATTCTCGCCGCTGAAG	

F – forward; R – reverse; pb – pares de bases

Fonte: Dallenne *et al.*, 2010

Além disso, para que os grupos pertencentes às subclassificações do gene *bla*_{CTX-M} fossem detectados, foi adotada a técnica de sequenciamento a partir do produto final da reação de PCR.

O sequenciamento foi realizado pela UC Berkeley DNA Facility (Universidade da Califórnia, Berkeley). A purificação do DNA foi feita através da técnica de imobilização reversível em fase sólida (SPRI – Beckman Coulter, Inc.) e, após este procedimento, o DNA purificado e os iniciadores forward e reverse (10µM) de cada família foram aplicados em uma placa para que o sequenciamento fosse realizado.

Já a detecção de genes *pAmpC* foi realizada em bactérias resistentes à amoxicilina/ácido clavulânico e cefoxitina. A reação de PCR (Tabela 5) foi feita com volume final de 20µL, contendo 10µL de Master Mix (2x), 2,6µL de água bidestilada estéril, 0,6µL dos iniciadores MOX, CIT e DHA (10 pmol), 0,5µL dos iniciadores ACC e EBC (10 pmol), 0,4µL do iniciador FOX (10 pmol) e 1µL da suspensão bacteriana.

Tabela 5 – Iniciadores utilizados para a detecção dos genes que codificam β-lactamases do tipo *pAmpC*

Gene	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)
MOX-like e CMY-1-like	MOX-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	520
	MOX-R	ATTTCTGACCGCATTTCAT	
LAT-like e CMY-2-like	CIT-F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	462
	CIT-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	
DHA-like	DHA-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	405
	DHA-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG	
ACC-like	ACC F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	346
	ACC R	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	
MIR e ACT	EBC-F	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302
	EBC-R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	
FOX-like	FOX-F	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190
	FOX-R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	

F – forward; R – reverse; pb – pares de bases
Fonte: Pérez-Pérez e Hanson, 2002

A pesquisa dos genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA* foi realizada em todas as amostras classificadas como MR.

A reação multiplex para a detecção dos genes *qnr* (Tabela 6) foi feita com volume final de 20µL, incluindo 10µL de Master Mix (2x), 0,5µL dos iniciadores *qnrAm* (10 pmol), *qnrSm* (10 pmol), *qnrCm* (10 pmol), *qnrDm* (10 pmol), 1µL do iniciador *qnrBm* (10 pmol), 1,5µL do iniciador *qnrVCm* (10 pmol) e 1µL da suspensão bacteriana. Já a reação para a detecção dos genes *aac(6')-Ib* e *qepA* foi realizada com volume final de 10µL, contendo 5µL de Master Mix (2x), 2µL de água bidestilada estéril, 0,5µL dos iniciadores *aac-Ib* e *qepA* (10 pmol) e 1µL da suspensão bacteriana.

Tabela 6 – Iniciadores utilizados para a detecção dos genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA*

Gene	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>qnrA</i>	QnrAm-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580
	QnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	
<i>qnrB</i>	QnrBm-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	264
	QnrBm-R	TTTGCYGYCCGCCAGTCGAA	
<i>qnrC</i>	QnrCm-F	GCGAATTTCCAAGGGGCAAA	135
	QnrCm-R	ACCCGTAATGTAAGCAGAGCAA	
<i>qnrD</i>	QnrDm-F	AGGTGTAGCATGTATGGAAAAGC	691
	QnrDm-R	ACATTGGGGCATTAGGCGTT	
<i>qnrS</i>	QnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428
	QnrSm-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	
<i>qnrVC</i>	QnrVCm-F	GAGYTKTATGGTTTAGAYCCTCG	72
	QnrVCm-R	TGTTCYTG YTGCCACGARCA	
<i>aac(6')-Ib</i>	Aac(6')-Ib-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482
	Aac(6')-Ib-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	
<i>qepA</i>	QepA-F	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	199
	QepA-R	CTTCCTGCCCGAGTATCGTG	

F – forward; R – reverse; pb – pares de bases

Fontes: Park *et al.*, 2006; Yamane *et al.*, 2007; Kraychete *et al.*, 2016

Tabela 7 – Condições das reações de PCR

Genes	Inicial	Amplificação	Final
<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-8/25} e <i>bla</i> _{CTX-M-9}	95°C/5'	95°C/30'' 58°C/60'' 72°C/2'' 30 ciclos	72°C/5'
MOX-like, CMY-1-like, LAT-like, CMY-2-like, DHA-like, ACC-like, MIR, ACT, FOX-like	94°C/3'	94°C/30'' 64°C/30'' 72°C/60'' 25 ciclos	72°C/7'
<i>qnrD</i> , <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrC</i> , <i>qnrVC</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>qepA</i>	95°C/10'	95°C/45'' 58°C/45'' 72°C/15'' 25 ciclos	72°C/3'

Fontes: Pérez-Pérez e Hanson, 2002; Park *et al.*, 2006; Yamane *et al.*, 2007; Dallenne *et al.*, 2010; Kraychete *et al.*, 2016

Os produtos das reações de PCR (amplicons) descritas acima foram submetidos a corridas de eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão tris-borato EDTA (TBE) 0,5x, a 90V. Para a visualização das bandas, os géis foram corados com brometo de etídio e analisados com o auxílio do sistema de imagem digital ImageQuant LAS 4000.

Para avaliar a presença do gene variante *aac(6')-Ib-cr*, que confere resistência aos aminoglicosídeos e à ciprofloxacina, e para que as famílias dos genes que codificam β-lactamases do tipo pAmpC fossem detectados, foi realizado o sequenciamento dos produtos finais das reações de PCR que amplificam os genes de interesse. A fim de verificar a presença de banda correspondente aos genes, foi realizada uma reação com a utilização de Master Mix incolor (2x), com o volume ajustado dos demais reagentes para a obtenção de um volume final de 25μL e com posterior corrida de eletroforese em gel de agarose a 1%. Os amplicons que apresentaram a banda correspondente ao gene *aac(6')-Ib* e à família CIT foram purificados com a aplicação de 8μL de ExoSAP - IT diluído em água bidestilada estéril (1:10) em 20μL do produto do PCR, e esta preparação foi submetida a uma curta ciclagem em termociclador, de forma a obedecer às condições descritas no Quadro 1.

Quadro 1 – Condições da reação de purificação dos amplicons

Passo 1 (1x)	Passo 2 (1x)	Passo 3 (1x)
37°C; 15'	80°C; 15'	4°C; ∞

Uma alíquota de 5µL de cada amplicon purificado foi disposta em uma placa de sequenciamento em duplicata, acrescida de 5µL de cada iniciador específico do gene de interesse (forward e reverse, 5pmol/µL). A placa foi enviada ao Laboratório Macrogen Inc., na Coreia do Sul, local onde o sequenciamento foi realizado.

4.6 Análises estatísticas

Os dados relacionados aos genes *qnrB*, *aac(6')-Ib-cr* e a produção de ESBL foram analisados através do programa *Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health* versão 3.01 (Dean *et al.*, 2013). As diferenças entre as variáveis categóricas foram analisadas por teste exato de Fisher. Valor de *p* bicaudal < 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Coleção de amostras de *E. coli*

Do total de 199 aves silvestres, 112 (56%) apresentaram amostras de *E. coli*, como mostra a Tabela 8. Destas 112 aves, foram isoladas 353 amostras de *E. coli*, sendo obtidas de 1 a 5 amostras de cada ave.

Tabela 8 – Número de aves positivas para o isolamento de *E. coli* de acordo com a espécie

Espécie	Nº (%) de aves
Gavião Carijó	32 (29)
Papagaio Verdadeiro	30 (27)
Carcará	10 (9)
Urubu de Cabeça Preta	9 (8)
Coruja Orelhuda	7 (6)
Coruja do Mato	7 (6)
Outras aves	17 (15)
Total	112

A partir da realização do teste de dupla-difusão nas amostras crescidas no meio MacConkey contendo ceftriaxona, 41 amostras foram armazenadas por apresentarem distorção no halo de inibição.

Todas as amostras crescidas no meio TSB contendo disco de ertapenem apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos ertapenem e imipenem no teste de disco-difusão, ou seja, nenhuma amostra era suspeita de produção de carbapenemases e, por isso, não foram armazenadas.

5.2 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos e de produção de ESBL

Do total de 353 amostras de *E. coli* submetidas ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos e de produção de ESBL, 117 amostras (33%) eram MR. Destas, 41 amostras (35%) eram produtoras de ESBL. O Gráfico 1 representa o isolamento de amostras de *E. coli* MR encontradas nas aves estudadas e o Gráfico 2 mostra o número de amostras isoladas que apresentaram susceptibilidade diminuída às diferentes classes de antimicrobianos utilizadas no teste. As Tabelas 9 e 10 mostram a frequência da resistência aos antimicrobianos nas amostras de *E. coli* isoladas e o perfil de resistência das amostras multirresistentes, respectivamente.

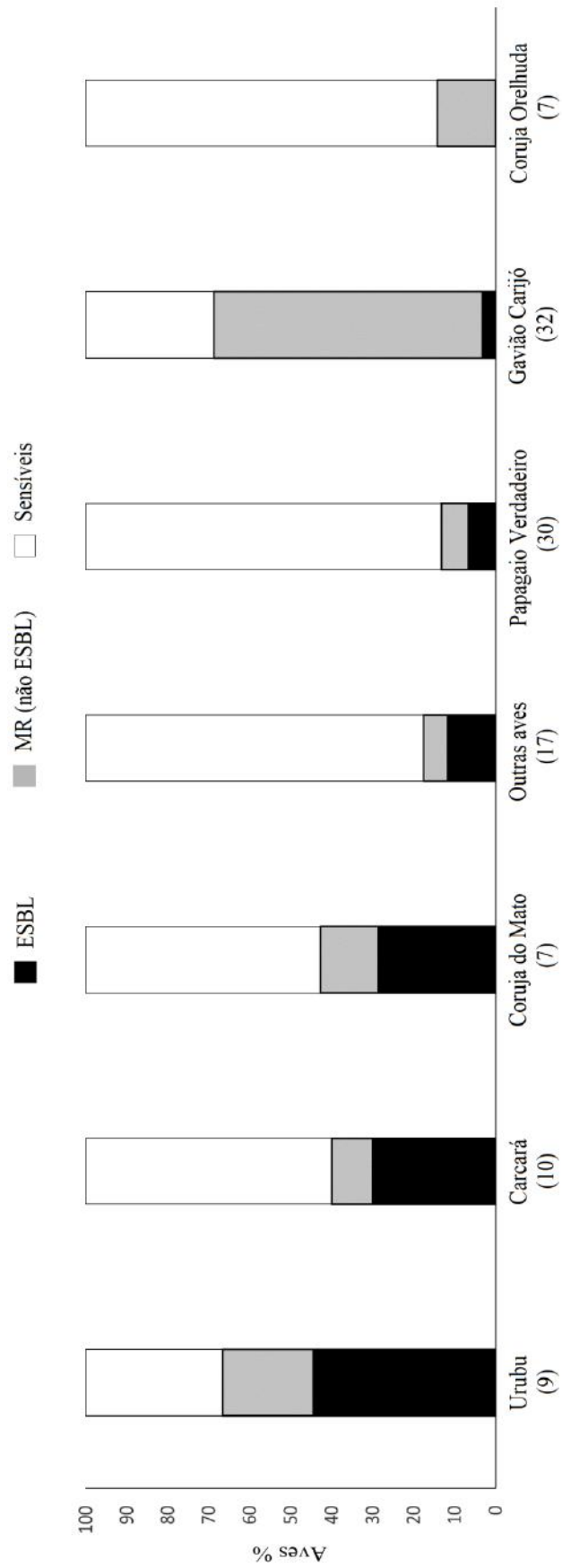


Gráfico 1 - Percentual de aves com amostras MR e produtoras de ESBL

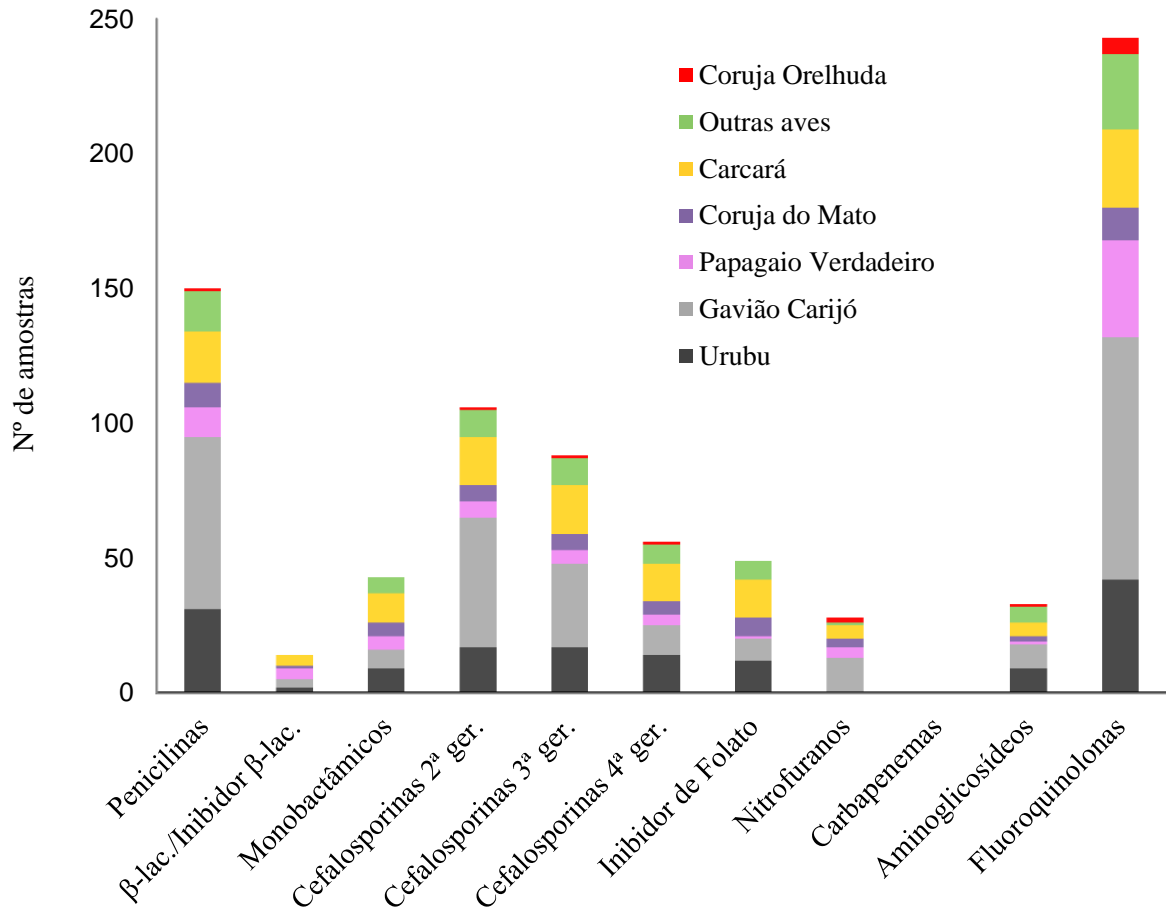


Gráfico 2 – Classes de antimicrobianos aos quais as amostras apresentaram resistência

Tabela 9 – Frequência de resistência aos antimicrobianos em 353 amostras isoladas das aves

Antimicrobiano	Número e (%) de amostras resistentes	
Ciprofloxacina	244	(69)
Ampicilina	145	(41)
Cefuroxima	109	(31)
Ceftriaxona	99	(28)
Cefotaxima	81	(23)
Ceftazidima	81	(23)
Cefepime	71	(20)
Sulfametoxazol/trimetoprim	49	(14)
Aztreonam	42	(12)
Nitrofurantoína	28	(8)
Gentamicina	24	(7)
Cefoxitina	18	(5)
Amoxicilina/ácido clavulânico	14	(4)
Amicacina	11	(3)
Ertapenem	0	(0)
Imipenem	0	(0)

Tabela 10 – Perfil de resistência das amostras multirresistentes discriminadas por produção de ESBL

Amostras produtoras de ESBL*	Aves (N de aves/ N de amostras)
AMK-CIP-SXT	Coruja do mato (1/1)
CIP-NIT-SXT	Coruja do mato (1/1)
CIP-GEN-SXT	Urubu (1/7), gavião carijó (1/3), carcará (1/2), outras aves (1/6)
AMK-CIP-GEN-SXT	Urubu (1/1), gavião carijó (1/1)
Amostras não produtoras de ESBL	
AMP-CEF -CIP	Urubu (2/3), gavião carijó (14/30), outras aves (1/1)
AMP-CIP-NIT	Gavião carijó (1/1)
AMP-CIP-SXT	Urubu (3/4), carcará (1/1), coruja do mato (1/1), gavião carijó (1/1)
AMP-AMK-CEF-CIP	Gavião carijó (1/1)
AMP-ATM-CEF-CIP	Caracara (1/1), gavião carijó (1/1)
AMP-ATM-CEF-NIT	Papagaio (1/1)
AMP-CIP-CEF-FOX	Gavião carijó (1/2)
AMP-CIP-CEF-NIT	Gavião carijó (4/6), outras aves (1/1)
AMP-CIP-NIT-SXT	Gavião carijó (1/1)
AMP-AMK-CIP-GEN-SXT	Gavião carijó (1/2)
AMP-AMK-CEF-CIP-NIT	Gavião carijó (1/1)
AMP-ATM-CEF-CIP-GEN	Carcará (1/1)
AMP-ATM-CEF-CIP-NIT	Carcará (1/1)
AMP-AMC-CEF-CIP-FOX	Gavião carijó (1/1), papagaio (1/1)
AMP-CEF -CIP-GEN-SXT	Carcará (1/1)
AMP-AMK-CEF-CIP-FOX-NIT	Coruja orelhuda (1/1)
AMP-AMC-ATM-CEF-CIP-FOX	Urubu (1/1), gavião carijó (1/1)
AMP-AMC-CIP-CEF-FOX-SXT	Carcará (1/3)
AMP-ATM-AMK-CEF-CIP-NIT	Gavião carijó (1/1)
AMP-AMC-ATM-CEF-FOX-NIT	Papagaio (1/1)
AMP-AMC-ATM-CEF-CIP-FOX-NIT	Papagaio (1/1)
AMP-ATM-AMC-CEF-CIP-FOX-SXT	Carcará (1/1)
AMP-AMC-AMK-CEF-CIP-FOX-NIT	Gavião carijó (1/1)
AMP-AMC-CIP-CEF-FOX-GEN-SXT	Coruja do mato (1/1)
AMP-AMC-ATM-CEF-CIP-FOX-NIT -SXT	Papagaio (1/1)

*Inclui apenas antimicrobianos não beta-lactâmicos; ESBL: β -lactamase de espectro estendido; N: número; AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; AMK: amicacina; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; CEF: cefalosporinas (inclui segunda, terceira e quarta gerações); FOX: cefoxitina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; NIT: nitrofurantoína.

5.3 Detecção dos genes *bla*_{CTX-M}

Os genes *bla*_{CTX-M} foram pesquisados nas 41 amostras que apresentaram resultado positivo nos testes fenotípicos para a produção de ESBL. Após as reações de PCR e a realização da técnica de sequenciamento, foram detectados genes pertencentes às famílias CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-15. Na Tabela 11 são apresentados os números de amostras que apresentavam cada um dos genes que codificam estas enzimas.

Tabela 11 – Número de amostras positivas para cada um dos genes do tipo CTX-M encontradas dentre amostras com teste positivo indicando produção de ESBL

Gene	Nº (%) de amostras positivas
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	17 (41)
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	12 (29)
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	10 (24)
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	2 (5)
Total	41

5.4 Detecção dos genes que codificam β -lactamase do tipo pAmpC

Para a detecção de genes que codificam β -lactamase do tipo pAmpC foram selecionadas as 13 amostras que apresentaram susceptibilidade diminuída à amoxicilina/ácido clavulânico ou cefoxitina. Destas, 6 (46%) apresentaram genes da família CIT. Após a realização do sequenciamento, foi verificada a presença do gene *bla*_{CMY-2}.

5.5 Detecção dos genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA*

Estes genes foram pesquisados nas 117 amostras que foram classificadas como MR, incluindo aquelas produtoras da ESBL.

O gene *qnrB* foi detectado em 31 amostras (26%). O gene *aac(6')-Ib* foi encontrado em 13 amostras e, após a realização da técnica de sequenciamento, foi verificada a presença de sua variante *aac(6')-Ib-cr* em 9 amostras (Tabela 12). O gene *qepA* não foi detectado.

Tabela 12 – Número de amostras positivas para os genes *qnrB*, *aac(6')-Ib* e *aac(6')-Ib-cr* de acordo com as espécies das aves estudadas

Espécies de aves	Nº de amostras	<i>qnrB</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
Gavião Carijó	53	5	4	4
Papagaio Verdadeiro	7	0	0	0
Carcará	19	10	3	0
Urubu de Cabeça Preta	21	10	1	1
Coruja Orelhuda	1	0	0	0
Coruja do Mato	7	0	5	4
Outras Aves	9	6	0	0
Total	117	31	13	9

5.6 Investigação da relação entre a presença dos genes *aac(6')-Ib-cr* e *qnrB* e a produção de ESBL

A possível associação entre a presença do gene *aac(6')-Ib-cr* ou do gene *qnrB* com a produção de ESBL foi investigada entre as 117 amostras MR. Dentre as 41 amostras produtoras de ESBL, 9 (22%) carregavam o gene *aac(6')-Ib-cr*, enquanto dentre as outras 76 amostras MR não produtoras de ESBL, nenhuma era portadora de tal gene. Dentre as 41 amostras produtoras de ESBL, 29 (71%) carregavam o gene *qnrB*, enquanto que dentre as outras 76 amostras MR mas não produtoras de ESBL, apenas 8 (11%) era portadora deste gene. Estas análises são apresentadas nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13 – Análise da associação entre presença do gene *aac(6')-Ib-cr* e a produção de ESBL dentre as 117 amostras multirresistentes

Gene <i>aac(6')-Ib-cr</i>	Característica e número (%) de amostras positivas		p
	ESBL	MR (não ESBL)	
Presente	9 (22)	0	<0.001
Ausente	32 (78)	76 (100)	
Total	41 (100)	76 (100)	117

ESBL: amostra produtora de β -lactamase de espectro estendido; MR: amostra multirresistente

Tabela 14 – Análise da associação entre presença do gene *qnrB* e a produção de ESBL dentre 117 amostras multirresistentes

Gene <i>qnrB</i>	Característica e número (%) de amostras positivas		p
	ESBL	MR (não ESBL)	
Presente	29 (71)	8 (11)	<0.001
Ausente	12 (29)	68 (89)	
Total	41	76	117

ESBL: amostra produtora de β -lactamase de espectro estendido; MR: amostra multirresistente

6 DISCUSSÃO

O presente estudo analisa cepas de *E. coli* obtidas de aves silvestres e o potencial que estes animais possuem em carrear bactérias resistentes em suas fezes. É possível que essas aves possam disseminar essas cepas resistentes para os ambientes por onde circulam.

Fezes de aves estão nos ambientes urbanos e rurais, e muitas espécies destes animais que já foram apontadas como carreadoras de *E. coli* produtoras de ESBL possuem uma mobilidade considerável (Guenther, Ewers e Wieler, 2011), e este deslocamento promove o estabelecimento de novos focos endêmicos de doenças, por voos de curta ou longa distância. Com isso, as aves podem contribuir para a disseminação da resistência pelo mundo (Peirano *et al.*, 2011). A propagação de cepas resistentes pode se expandir a partir da interação destas aves com ecossistemas contaminados (Guenther, Ewers e Wieler, 2011), ou seja, além do próprio uso de antimicrobianos na clínica veterinária, o contato com água e alimentos contaminados pode ser considerado a principal rota de transmissão de bactérias que seriam de origem humana a animais silvestres (Cole *et al.*, 2005), incluindo as aves.

A resistência a múltiplos antimicrobianos tem se tornado estabelecida em bactérias Gram-negativas, como *E. coli* (Szmolka e Nagy, 2013). Um estudo realizado em Portugal (Radhouani *et al.*, 2012) mostrou a presença desta bactéria em amostras fecais de 42 gaviões (*Buteo buteo*), uma das aves de rapina mais abundantes do país. Foram isoladas 36 amostras de *E. coli*, nenhuma produtora de ESBL. Porém, estas amostras apresentaram um nível considerável de resistência aos antimicrobianos tetraciclina (75%), estreptomicina (75%), ampicilina (61%), ciprofloxacina (50%), amicacina (47%), cefoxitina (44%), tobramicina (42%) e cloranfenicol (42%). Também foram encontradas amostras resistentes a amoxicilina/ácido clavulânico (39%), ácido nalidíxico (33%), sulfametoxazol/trimetoprim (22%), gentamicina (19%), imipenem (6%) e aztreonam (3%). Apenas uma amostra apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. As informações contidas neste estudo sugerem que aves selvagens, que habitam seus ecossistemas de origem, também podem ser carreadoras de bactérias MR, assim como este presente estudo revela a presença de cepas resistentes em aves silvestres, que tenham tido toda ou parte de seu ciclo de vida no território brasileiro.

No Brasil, um estudo desenvolvido por Borges *et al.* (2017) detectou a presença de genes de resistência em 246 amostras de *E. coli* isoladas de 123 aves selvagens de vida livre internadas em um hospital veterinário de São Paulo. Aproximadamente 57% das amostras

bacterianas tinham o perfil de MR, apresentando resistência aos antimicrobianos ceftiofur (71%), nitrofurantoína (57%), canamicina (43%), tetraciclina (43%), ampicilina (29%), cefotaxima (14%), fosfomicina (14%), ácido nalidíxico (14%), norfloxacin (14%) e sulfametoxazol/trimetoprim (14%). Em comparação com o presente estudo, os resultados encontrados em aves selvagens de São Paulo possuem maiores níveis de resistência do que as aves estudadas no estado do Rio de Janeiro.

Bactérias que expressam a β -lactamase pAmpC, que confere resistência a diversos β -lactâmicos, são motivos de grande preocupação na clínica (Girlich *et al.*, 2000; Thomson e Smith Moland, 2000). Não foram encontrados na literatura estudos que relatassem a presença deste gene em amostras de *E. coli* isoladas de aves selvagens ou silvestres. Porém, neste presente estudo, a família CIT foi detectada em 6 amostras.

Desde o início do século 21, estudos têm mostrado o aumento da variedade de enzimas do tipo CTX-M na clínica e na comunidade (Bonnet, 2004; Pitout e Laupland, 2008; Mshana *et al.*, 2009). Esta β -lactamase é o tipo de ESBL mais prevalente em *E. coli* no mundo (Perez *et al.*, 2007) e, em contraste com o cenário humano, as famílias do gene *bla*_{CTX-M} têm sido frequentemente encontradas em animais selvagens. Diferentes estudos já reportaram a detecção dos genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-32} e *bla*_{CTX-M-9} nestes animais, como descrito na Tabela 15.

Tabela 15 – Famílias do gene *bla*_{CTX-M} encontradas em aves selvagens

Espécies de aves	CTX-M	Local e período de isolamento
Corujas (várias espécies)	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	Portugal (2003-2004)
Águia-de-asa-redonda (<i>B. buteo</i>) Coruja-das-torres (<i>T. alba</i>) Coruja Aluco (<i>T. aluco</i>)	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	Portugal (2008)
Águia-de-asa-redonda (<i>B. buteo</i>)	<i>bla</i> _{CTX-M-32} , <i>bla</i> _{CTX-M-1}	Portugal (2007-2008)
Gaivota-de-patas-amarelas (<i>L. michahellis</i>)	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	França (2008)
Gaivota Guincho-comum (<i>C. ridibundus</i>)	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	Suécia (2008)
Gaivotas (<i>L. fuscus</i> e <i>L. cachinnans</i>)	<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-9} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{CTX-M-32}	Portugal (2007-2008)
Gaivota-parda (<i>Larus canus</i>) e Gaivota Guincho-comum (<i>C. ridibundus</i>)	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	Holanda (2010-2011)
Melro-preto (<i>Turdus merula</i>), Pombo-comum (<i>Columba livia</i>) e Ganso-grande-de-testa-branca (<i>Anser albifrons</i>)	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	Alemanha (2010)

Fontes: Costa *et al.* (2006), Bonnedahl *et al.* (2009), Bonnedahl *et al.* (2010), Guenter *et al.* (2010), Pinto *et al.* (2010), Radhouani *et al.* (2010), Simoes *et al.* (2010), Veldman *et al.* (2013)

Os diferentes tipos de ESBL têm sido frequentemente associados à resistência a quinolonas devido à possibilidade destes genes estarem localizados em um mesmo plasmídeo (Carattoli, 2009; Strahilevitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011). Outros estudos mostram pesquisas de resistência a quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR) em amostras de *E. coli* isoladas de espécimes clínicos, animais selvagens, ambiente e alimentos. Neste presente estudo, o gene *aac(6')-Ib-cr*, variante da acetiltransferase de aminoglicosídeos AAC(6')-Ib, e o gene *qnrB* foram encontrados em 9 e 31 amostras, respectivamente, enquanto o gene *qepA*, que codifica uma bomba de efluxo, não foi detectado. Tais genes foram detectados em associação, estatisticamente significativa, com a produção de ESBL. Como a produção de ESBL é mediada em plasmídios, esse dado indica que os genes *aac(6')-Ib-cr* e *qnrB* estejam associados aos mesmos plasmídios nessas amostras. Experimentos de conjugação poderiam evidenciar a cotransferência desses elementos genéticos em um mesmo plasmídeo.

Com a análise dos achados deste estudo, pode-se observar a presença significativa de genes de resistência em amostras de *E. coli* em aves do Estado do Rio de Janeiro.

7 CONCLUSÕES

- As 353 amostras de *E. coli* isoladas das 112 aves silvestres tiveram seu perfil fenotípico de susceptibilidade analisado. Foram observadas amostras sensíveis, MR e produtoras de ESBL, e não foram detectadas amostras produtoras de carbapenemases.
- Foram detectados os genes que codificam ESBL do tipo CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-15) nas amostras que apresentaram resultado fenotípico positivo.
- Foram detectados genes do grupo CMY-2, da família CIT (pAmpC), e os genes *qnrB* e *aac(6')-Ib-cr*.
- A presença de amostras resistentes na microbiota das aves representa uma possível extensão da contaminação ambiental.
- Os resultados encontrados revelam a presença de amostras multirresistentes fora do ambiente hospitalar, podendo causar impacto na saúde ambiental.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albornoz, E., Tijet, N., De Belder, D., Gomez, S., Martino, F., Corso, A., Melano, R. G. e Petroni, A. (2017). *qnrE1*, a member of a new family of plasmid-located quinolone resistance genes, originated from the chromosome of *Enterobacter* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e02555-16.
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J. e Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 251-259.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 289, 321-331.
- Anderson, K. F., Lonsway, D. R., Rasheed, J. K., Biddle, J., Jensen, B., McDougal, L. K., Carey, R. B., Thompson, A., Stocker, S., Limbago, B. e Patel, J. B. (2007). Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2723-2725.
- ANVISA (2004). Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Módulo V. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil.
- Banerjee, R., Johnston, B., Lohse, C., Porter, S. B., Clabots, C. e Johnson, J. R. (2013). *Escherichia coli* sequence type 131 is a dominant, antimicrobial-resistant clonal group associated with healthcare and elderly hosts. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 34, 361-369.
- Bergstrom, S. e Normark, S. (1979). Beta-Lactam resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* caused by elevated production of the *ampC*-mediated chromosomal beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16, 427-433.
- Besser, T. E., Davis, M. A. e Walk, S. T. (2011). *Escherichia coli* O157:H7 in reservoir hosts. In: *Population Genetics of Bacteria*. Walk S. T., Feng, P. C. H., eds. (Washington: ASM Press), pp. 303-324.
- Bonnedahl, J., Drobni, M., Gauthier-Clerc, M., Hernandez, J., Granholm, S., Kayser, Y., Melhus, A., Kahlmeter, G., Waldenström, J., Johansson, A. e Olsen, B. (2009). Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M Type ESBL between Humans and Yellow-Legged Gulls in the South of France. *Plos One* 4 (6), e5958.
- Bonnedahl, J., Drobni, P., Johansson, A., Hernandez, J., Melhus, A., Stedt, J., Olsen, B. e Drobni, M. (2010). Characterization, and comparison, of human clinical and black-headed gull (*Larusridi bundus*) extended-spectrum beta-lactamase-producing bacterial isolates from Kalmar, on the south-east coast of Sweden. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1939-1944.
- Bonnet, R., Sampaio, J. L. M., Labia, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C. e Sirot, J. (2000). A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxima-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1936-1942.
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1-14.
- Borges, C. A., Beraldo, L. G., Maluta, R. P., Cardozo, M. V., Barboza, K. B., Guastalli, E. A. L., Kariyawasam, S., DebRoy, C. e Ávila, F. A. (2016). Multidrug-resistant pathogenic *Escherichia coli* isolated from wild birds in a veterinary hospital. *Avian Pathology*, 46.
- Borges, C. A., Cardozo, M. V., Beraldo, L. G., Oliveira, E. S., Maluta, R. P., Barboza, K. B., Werther, K. e Ávila, F. A. (2017). Wild birds and urban pigeons as reservoirs for diarrheagenic *Escherichia coli* with zoonotic potential. *J. Microb.* 55 (5), 344-348.
- Botelho, L. A. B., Kraychete, G. B., Silva, J. L. C., Regis, D. V. V., Picão, R. C., Moreira, B. M. e Bonelli, R. R. (2015). Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 110(2), 249-254.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (4), 933-951.

- Brenner, D. J., Fanning, G. R., Skerman, F. J. e Falkow, S. (1972). Polynucleotide sequence divergence among strains of *Escherichia coli* and closely related organisms. *J. Bacteriol.* 109, 953–965.
- Campana, E. H., Chuster, S. G., da Silva, I. R., Paschoal, R. P., Bonelli, R. R., Moreira, B. M. e Picão, R. C. (2016a). Modified Carba NP test for the detection of carbapenemase production in gram-negative rods: optimized handling of multiple samples. *Braz. J. Microbiol.* 48 (2), 242–245.
- Campana, E. H., Montezzi, L. F., Paschoal, R. P. e Picão, R. C. (2016b). NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 goes to the beach. *Intern. J. Antimicrob. Agents* 49, 119–120.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2227–2238.
- Caroff, N., Espaze, E., Berard, I., Richet, H. e Reynaud, A. (1999). Mutations in the *ampC* promoter of *Escherichia coli* isolates resistant to oxyiminocephalosporins without extended spectrum beta-lactamase production. *FEMS Microbiol. Lett.* 173, 459–465.
- Caroff, N., Espaze, E., Gautreau, D., Richet, H. e Reynaud, A. (2000). Analysis of the effects of -42 and -32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing ampC. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 783–788.
- Castellani, A. e Chalmers, A. J. (1919). *Manual of Tropical Medicine*. In: Schizomycetes. 3rd ed. (New York: Williams Wood and Co.), pp. 941–943.
- Cattoir, V., Poirel, L. e Nordmann, P. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3801–3804.
- Clark, C. G., Kruczkiewicz, P., Guan, C., McCorrister, S. J., Chong, P., Wylie, J., van Caesele, P., Tabor, H. A., Snarr, P., Gilmour, M. W., Taboada, E. N. e Westmacott, G. R. (2013). Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes. *J. Microbiol. Methods* 94, 180–191.
- CLSI (2015). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 25th ed. CLSI supplement M100. Wayne, P. A.: Clinical and Laboratory Standards Institute, USA. Vol. 35 (3).
- Cole, D., Drum, D. J., Stalknecht, D. E., White, D. G., Lee, M. D., Ayers, S., Sobsey, M. e Maurer, J. J. (2005). Free-living Canada geese and antimicrobial resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 935–938.
- Costa, D., Poeta, P., Saenz, Y., Vinue, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., Zarazaga, M., Rodrigues, J. e Torres, C. (2006). Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 1311–1312.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M. e Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 822–880.
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decre, D., Favier, C. e Arlert, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65 (3), 490–495.
- Dalmarco, E. M., Blatt, S. L. e Córdova, C. M. M. (2006). Identificação laboratorial de β-lactamases de espectro estendido (ESBLs) – Revisão. *Rev. Bras. Anál. Clín.* 38 (3), 171–177.
- Dean A.G., Sullivan K.M., Soe M.M. (2013). OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. Disponível em: <www.OpenEpi.com>. Atualizado em: 06/04/2013. Acesso em: 13/11/2017.
- de Araujo, C. F. M., Silva, D. M., Carneiro, M. T., Ribeiro, S., Fontana-Maurell, M., Alvarez, P., Asensi, M. D., Zahner, V. e Carvalho-Assef, A. P. D. (2016). Detection of carbapenemase genes in aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 4380–4383.
- Dho-Moulin, M. e Fairbrother, J. M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30, 299–316.

- Dubois, D., Grare, M., Prere, M. F., Segonds, C., Marty, N. e Oswald, E. (2012). Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2568–2576.
- Euzéby, J. P. (2017). List of Prokaryotic names with standing in Nomenclature: a folder available on the internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, 47, 590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/>>. Acesso em: 28/4/2017.
- Forward, K. R., Willey, B. M., Low, D. E., McGeer, A., Kapala, M. A., Kapala, M. M. e Burrows, L. L. (2001). Molecular mechanisms of cefoxitin resistance in *Escherichia coli* from the Toronto area hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 41, 57–63.
- Girlich, D., Naas, T., Bellais, S., Poirel, L., Karim, A. e Nordmann, P. (2000). Heterogeneity of AmpC cephalosporinases of *Hafnia alvei* clinical isolates expressing inducible or constitutive ceftazidime resistance phenotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3220–3223.
- Gordon, D. M., Bauer, S. e Johnson, J. R. (2002). The genetic structure of *Escherichia coli* populations in primary and secondary habitats. *Microbiology* 148, 1513–1522.
- Gordon, D. M. e Cowling, A. (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: Host and geographic effects. *Microbiology* 149, 3575–3586.
- Guenther, S., Grobbel, M., Beutlich, J., Bethe, A., Friedrich, N. D., Goedecke, A., Luebke-Becker, A., Guerra, B., Wieler, L. H. e Ewers, C. (2010). CTXM-15-type extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* from wild birds in Germany. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 641–645.
- Guenther, S., Ewers, C. e Wieler, L. H. (2011). Extended-spectrum beta-lactamases producing E-coli in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Front. Microbiol.* 2, 246.
- He, Y., Li, H., Lu, X., Stratton, C. W. e Tang, Y. W. (2010). Mass spectrometry biotyper system identifies enteric bacterial pathogens directly from colonies grown on selective stool culture media. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3888–3892.
- Hernandez, J., Bonnedahl, J., Eliasson, I., Wallensten, A., Comstedt, P., Johansson, A., Granholm, S., Melhus, A., Olsen, B. e Drobni, M. (2010). Globally disseminated human pathogenic *Escherichia coli* of 025b-ST131 clone, harbouring blaCTX-M-15, found in glaucous-winged gull at remote Commander Islands, Russia. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 329-332.
- Hyma, K. E., Lacher, D. W., Nelson, A. M., Bumbaugh, A. C., Janda, J. M., Strockbine, N. A., Young, V. B. e Whittam, T. S. (2005). Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains. *J. Bacteriol.* 187, 619–628.
- Jacoby, G. A., Gacharna, N., Black, T. A., Miller, G. H. e Hooper, D. C. (2009). Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1665–1666.
- Jamborova, I., Dolejska, M., Vojtech, J., Guenther, S., Uricariu, R., Drozdowska, J., Papousek, I., Pasekova, K., Meissner, W., Hordowski, J., Cizek, A. e Literak, I. (2015). Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 648 –657.
- Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G. e Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10, 867–878.
- Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Johnston, B., Clabots, C., Roberts, P. L., Billig, M., Riddell, K., Rogers, P., Qin, X., Butler-Wu, S., Price, L. B., Aziz, M., Nicolas-Chanoine, M. H., Debroy, C., Robicsek, A., Hansen, G., Urban, C., Platell, J., Trott, D. J., Zhanel, G., Weissman, S. J., Cookson, B. T., Fang, F. C., Limaye, A. P.,

- Scholes, D., Chattopadhyay, S., Hooper, D. C. e Sokurenko, E. V. (2013). Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 207, 919–928.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. e Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123–140.
- Karim, A., Poirel, L., Nagarajan, S. e Nordmann, P. (2001). Plasmid mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol. Lett.* 201, 237–241.
- Komp Lindgren, P., Karlsson, A. e Hughes, D. (2003). Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3222–3232.
- Kraychete, G. B., Botelho, L. A. B., Campana, E. H., Picão, R. C. e Bonelli, R. R. (2016). Updated multiplex PCR for detection of all six plasmid-mediated *qnr* gene families. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (12), 7524–7526.
- Lahey Clinic (2017). Beta-lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. Disponível em: <<http://www.lahey.org/Studies/>>. Acesso em: 28/04/2017.
- Leimbach, A., Hacker, J. e Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 358, 3–32.
- Livermore, D. (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microb. Rev.* 8, 557-584.
- Madec, J-Y., Haenni, M., Nordmann, P. e Poirel, L. (2017). ESBL/AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals: a threat for humans?. *Clinical Microbiology and Infection*. Manuscrito.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T. e Monnet, D. L. (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18 (3), 268–281.
- Mammeri, H., Nordmann, P., Berkani, A. e Eb., F. (2008). Contribution of extended-spectrum AmpC (ESAC) beta-lactamases to carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 282, 238–240.
- Martinez, J. L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. Biol. Sci.* 276, 2521–2530.
- Martínez-Martínez, L., Pascual, A. e Jacoby, G. A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 351, 797–799.
- Monira, S., Nakamura, S., Gotoh, K., Izutsu, K., Watanabe, H., Alam, N. H., Endtz, H. P., Cravioto, A., Ali, S. I., Nakaya, T., Horii, T., Iida, T. e Alam, M. (2011). Gut microbiota of healthy and malnourished children in Bangladesh. *Frontiers Microbiol.* 2, 228.
- Montezzi, L. F., Campana, E. H., Corrêa, L. L., Justo, L. H., Paschoal, R. P., Da Silva, I. L. V. D., Souza, M. C. M., Drolshagen, M. e Picão, R. C. (2015). Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. *Intern. J. Antimicrob. Agents* 45(2), 174–177.
- Mshana, S. E., Imirzalioglu, C., Hossain, H., Hain, T., Domann, E. e Chakraborty, T. (2009). Conjugative IncFI plasmids carrying CTX-M-15 among *Escherichia coli* ESBL producing isolates at a University hospital in Germany. *BMC Infect. Dis.* 9, 97.
- Nataro, J. P. e Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Nikaido, H. (1996). Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 178, 5853–5859.

- Olsson, O., Bergström, S. e Normark, S. (1982). Identification of a novel *ampC* beta-lactamase promoter in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 1, 1411–1416.
- Olsson, O., Bergström, S., Lindberg, F. P. e Normark, S. (1983). *ampC* beta-lactamase hyperproduction in *Escherichia coli*: natural ampicillin resistance generated by horizontal chromosomal DNA transfer from *Shigella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80,7556–7560.
- Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. A., Sahm, D. e Hooper, D. (2006). Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3953–3955.
- Paterson, D. L. e Bonomo, R. A. (2005). *Clin. Microbiol.* Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Rev.* 18 (4), 657–686.
- Peirano, G., Laupland, K. B., Gregson, D. B. e Pitout, J. D. D. (2011). Colonization of returning travelers With CTX-M-producing *Escherichia coli*. *J. Travel Med.* 18, 299–303.
- Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K. M. e Bonomo, R. A. (2007). The continuing challenge of ESBLs. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 459–469.
- Pérez-Pérez, F. J. e Hanson, N. D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40 (6), 2153-2162.
- Périchon, B., Courvalin, P. e 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*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (7), 2464–2469.
- Peterson, A. T., Vieglais, D. A. e Andreasen, J. K. (2003). Migratory birds modeled as critical transport agents for West Nile virus in North America. *Vector. Borne Zoonotic Dis.* 3, 27-37.
- Philippon, A., Arlet, G. e Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1–11.
- Pinto, L., Radhouani, H., Coelho, C., Martins Da Costa, P., Simoes, R., Brandao, R. M. L., Torres, C., Igrejas, G., e 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4118–4120.
- Pitout, J. D. e Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect. Dis.* 8, 159–166.
- Pitout, J. D. (2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 3, 9.
- Qiu, J. (2005). Ornithology: flight of the navigators. *Nature* 437, 804-806.
- Radhouani, H., Pinto, L., Coelho, C., Goncalves, A., Sargo, R., Torres, C., Igrejas, G. e Poeta, P. (2010). Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M classes in faecal samples of common buzzards (*Buteo buteo*). *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 171–173.
- Radhouani, H., Poeta, P., Gonçalves, A., Pacheco, R., Sargo, R. e Igrejas, G. (2012). Wild birds as biological indicators of environmental pollution: antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* and enterococci isolated from common buzzards (*Buteo buteo*). *J. Med. Microb.* 61, 837–843.
- Radhouani, H., Silva, N., Poeta, P. P., Torres, C., Correia, S. e Igrejas, G. (2014). Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment, and human health. *Frontiers in Microbiology* 5, 1–12.
- Rappole, J. H. e Hubalek, Z. (2003). Migratory birds and West Nile virus. *J. Appl. Microbiol.* 94(Suppl.), 47S-58S.

- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., Bush, K. e Hooper, D. C. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* 12, 83– 88.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Cano, M. E., Velasco, C., Martínez-Martínez, L. e Pascual, A. (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J. Infect. Chemother.* 17, 149–182.
- Rolland, R. M., Hausfater, G., Marshall, B. e Levy, S. B. (1985). Antibiotic-resistant bacteria in wild primates: increased prevalence in baboons feeding on human refuse. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 791-794.
- Sabaté, M., Tarrago, R., Navarro, F., Miro, E., Vergés, C., Barbé, J. e Prats, G. (2000). Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime- hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1970–1973.
- Sanders, C. C. e Sanders, W. E. Jr. (1992). Beta-Lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis.* 15(5), 824–839.
- Santacruz, A., Collado, M. C., García-Valdés, L., Segura, M. T., Martín-Lagos, J. A., Anjos, T., Martí-Romero, M., Lopez, R. M., Florido, J., Campoy, C. e Sanz, Y. (2010). Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br. J. Nutr.* 104, 83–92.
- Sato, G., Oka, C., Asagi, M. e Ishiguro, N. (1978). Detection of conjugative R plasmids conferring chloramphenicol resistance in *Escherichia coli* isolated from domestic and feral pigeons and crows. *Zentralbl. Bakteriol. Orig. A* 241, 407–417.
- Scheutz, F. e Strockbine, N. A. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – Volume 2: The Proteobacteria; Part B: The *Gammaproteobacteria*. In: Genus I. *Escherichia*. Garrity George Brenner, D. J., Krieg, N. R. e Staley, J. R., eds. (New York: Springer), pp. 607–623.
- Simoes, R. R., Poirel, L., Da Costa, P. M. e Nordmann, P. (2010). Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 110–112.
- Siu, L. K., Lu, P. L., Chen, J. Y., Lin, F. M. e Chang, S. C. (2003). High-level expression of *ampC* beta-lactamase due to insertion of nucleotides between -10 and -35 promoter sequences in *Escherichia coli* clinical isolates: cases not responsive to extended-spectrum-cephalosporin treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2138–2144.
- Skurnik, D., Ruimy, R., Andreumont, A., Amarin, C., Rouquet, P., Picard, B. e Denamur, E. (2006). Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 1215-1219.
- Smith, P. B., Tomfohrde, K. M., Rhoden, D. L. e Balows, A. (1972). API System: a Multitube Micromethod for Identification of *Enterobacteriaceae*. *Appl. Microbiol.* 24 (3), 449-452.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C. e Robicsek, A. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 664–689.
- Szmolka, A. e Nagy, B. (2013). Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Frontiers in Microbiology* 4, 258.
- Takahashi, A., Muratani, T., Yasuda, M., Takahashi, S., Monden, K., Ishikawa, K., Kiyota, H., Arakawa, S., Matsumoto, T., Shima, H., Kurazono, H. e Yamamoto, S. (2009). Genetic profiles of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates obtained from patients with cystitis: phylogeny, virulence factors, PAI_{usp} subtypes, and mutation patterns. *J. Clin. Microbiol.* 47,791–795.
- Tan, K. E., Ellis, B. C., Lee, R., Stamper, P. D., Zhang, S. X. e Carroll, K. C. (2012). Prospective evaluation of a matrixassisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3301–3308.

- Thomson, K. S. e Smith Moland, E. (2000). Version 2000: the new beta-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect.* 2, 1225–1235.
- Tzouvelekis, L. S., Tzelepi, E., Tassios, P. T. e Legakis, N. J. (2000). CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14, 137–143.
- van den Beld, M. J. e Reubsaet, F. A. (2012). Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 899–904.
- Varela, A. R., Macedo, G. N., Nunes, O. C. e Manaia, C. M. (2015). Genetic characterization of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* from urban streams and municipal and hospital effluents. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 5.
- Veldman, K., van Tulden, P., Kant, A., Testerink, J. e Mevius, D. (2013). Characteristics of Cefotaxime-Resistant *Escherichia coli* from Wild Birds in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (24), 7556–7561.
- Walther-Rasmussen, J. e Høiby, N. (2002). Plasmid-borne AmpC beta-lactamases. *Can. J. Microbiol.* 48, 479–493.
- Weigel, L. M., Steward, C. D. e Tenover, F. C. (1998). *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2661–2667.
- Weiman, S. (2016). Antibiotic Resistance Spreads through Diverse Species and Habitats, Part I. *Microbe* 11 (5), 201-207.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T. e Arakawa, Y. (2007). New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3354–3360.