

**UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**PRODUÇÃO FENOTÍPICA DE BETALACTAMASES DE AMPLO
ESPECTRO EM *ESCHERICHIA COLI* ASSOCIADA ÀS INFECÇÕES
NO TRATO URINÁRIO DE CÃES, GATOS E HUMANOS.**

Hosana Dau Ferreira de Souza

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**PRODUÇÃO FENOTÍPICA DE BETALACTAMASES DE AMPLO
ESPECTRO EM *ESCHERICHIA COLI* ASSOCIADA ÀS INFECÇÕES
NO TRATO URINÁRIO DE CÃES, GATOS E HUMANOS.**

HOSANA DAU FERREIRA DE SOUZA

Sob Orientação da Professora
Shana de Mattos de Oliveira Coelho

e Co-orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Agosto de 2021

S725p Souza, Hosana Dau Ferreira de , 1987-
Produção fenotípica de betalactamases de amplo espectro em Escherichia coli associada às infecções no trato urinário de cães, gatos e humanos. / Hosana Dau Ferreira de Souza. - Vassouras, 2021.
58 f.: il.

Orientadora: Shana de Mattos de Oliveira Coelho.
Coorientadora: Miliane Moreira Soares de Souza.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2021.

1. Resistência antimicrobiana. 2. Saúde Única. 3. Escherichia coli. 4. ESBL. I. Coelho, Shana de Mattos de Oliveira, 1980-, orient. II. Souza, Miliane Moreira Soares de, 1970-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 3773/2021 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.061459/2021-45

Seropédica-RJ, 27 de agosto de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

HOSANA DAU FERREIRA DE SOUZA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/08/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

(Assinado digitalmente em 27/08/2021 17:24)
SHANA DE MATTOS DE OLIVEIRA COELHO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR DMIV
(12.28.01.00.00.00.54)
Matrícula: 1722406

(Assinado digitalmente em 27/08/2021 17:48)
INGRID ANNES PEREIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 094.792.277-62

(Assinado digitalmente em 27/08/2021 18:42)
DAYANNE ARAÚJO DE MELO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 122.524.547-84

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 3773, ano: 2021, tipo: ATA, data de emissão: 27/08/2021 e o código de verificação: 617bd0a24b

DEDICATÓRIA

"Não importa o quão lentamente você vá, desde que você não pare. "

Confúcio

Dedico este trabalho aos meus filhos e família por sempre me apoiarem.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder a oportunidade de viver, sentir, evoluir e amar.

À minha mãe e irmão: obrigada por estarem sempre comigo, me apoiando e acreditando em mim. Obrigada pelas longas chamadas de vídeo, e por estarem tão presentes apesar da distância. Amo vocês!!

Aos meus filhos Pedro e Vicente, por me fazerem uma pessoa melhor e por me ensinarem a amar.

À minha sogra Solange e a tia Aidinha, por me incentivarem, e por me darem todo apoio com meus filhos, para que eu realizasse meu sonho. Sem vocês não seria possível essa conquista. Gratidão!!

Ao meu pai Ronaldo e a minha avó Lili, pelo amor, carinho e proteção. Nós conseguimos (*in memoriam*)!

Ao avô João por ter me adotado como neta, e por ter me apoiado e amparado (*in memoriam*).

À minha orientadora Shana, pela oportunidade de realizar meu sonho, por todos os conselhos, por confiar em mim, pela amizade. E, principalmente por me mostrar o quanto Deus está presente em cada um de nós.

Às professoras Miliane Souza e Irene Coelho, por todo suporte recebido ao longo destes anos.

Às minhas amigas de laboratório: Thereza, Mayara, Natália, Carolina e Juliana, por todo apoio no experimento. Sem vocês nada seria possível. Obrigada!

Ao LabGelson, em especial ao Dr. Gustavo Peixoto e toda equipe pela parceria e apoio.

Ao LabacVet e aos colegas por todo apoio.

Ao colega Igor Patrick Vasconcelos Vieira, pela contribuição com as análises estatísticas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)-Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

À todos que contribuíram nessa etapa.

RESUMO

SOUZA, Hosana Dau Ferreira. **Produção fenotípica de betalactamases de amplo espectro em *Escherichia coli* associada às infecções no trato urinário de cães, gatos e humanos**. 43p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

A resistência antimicrobiana é uma problemática em infecções causadas por enterobactérias, principalmente por cepas produtoras de betalactamases, que proporcionam resistência a uma ampla gama de antimicrobianos. *Escherichia coli* é uma bactéria comensal da microbiota gastrointestinal associada às infecções no trato urinário e cepas produtoras destas enzimas são importantes patógenos na Medicina Veterinária e Humana. Apesar da detecção da produção de betalactamase ser padronizada por alguns comitês, como CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) e BrCAST (Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) as divergências entre eles geram extrema dificuldade na padronização interlaboratorial, gerando uma importante barreira ao conhecimento da real epidemiologia dessas enzimas. Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar o perfil de resistência aos betalactâmicos em *E. coli* isoladas de amostras de urina de cães, gatos e humanos com infecções no trato urinário, além de pesquisar - através da técnica de difusão em disco com leitura interpretativa, a produção de ESBL (Betalactamase de Espectro Estendido), AmpC e Carbapenemases, comparando os métodos de detecção preconizados pelos documentos normativos. O estudo foi realizado com 100 cepas de *E. coli* a partir das 273 amostras de urina provenientes de humanos, e 97 a partir de 103 amostras de 67 cães e 30 gatos, totalizando 197 isolados. Todos os isolados apresentaram perfil de resistência inferior a 50% frente aos antimicrobianos testados, sendo a ampicilina o menos eficaz, considerando tanto os pontos de corte do CLSI quanto do BrCAST. Um total de 10% (10/100) e 11,16% (22/197) de *E. coli* provenientes de amostras humanas e animais, respectivamente, foram suspeitas de produzirem ESBL no teste de triagem. Dentre elas, 56,25% (18/32) apresentaram a suspeita considerando os pontos de corte de ambos os documentos preconizados. Do total de isolados suspeitos, 81,25% (26/32) foram confirmados nos testes considerando pelo menos um documento normativo. Apenas 1% (1/100) e 5,15% (5/97) das amostras humanas e animais foram produtoras de AmpC, respectivamente e dentre estes, quatro (66,7%, 4/6) foram co-produtores de ESBL. Por fim, dois isolados, de origem humana, apresentaram resistência ao ertapenem, indicando possível produção de carbapenemase. A emergência de cepas bacterianas multirresistentes é preocupante pelo aspecto da Saúde Única, uma vez que os animais domésticos podem ser reservatórios e agentes transmissores para os seres humanos e vice-versa, onde o ambiente também atua como potencializador contribuindo de forma significativa para esta problemática.

PALAVRAS-CHAVE: Resistência antimicrobiana, Saúde Única, *Escherichia coli*, ESBL.

ABSTRACT

SOUZA, Hosana Dau Ferreira. **Phenotypic production of extended-spectrum beta-lactamase in *Escherichia coli* associated with urinary tract infections in dogs, cats and humans**. 43p. Dissertation (Master's in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Antimicrobial resistance is a problem in infections caused by enterobacteria, mainly by strains that produce beta-lactamases, which provide resistance to a wide range of antibiotics. *Escherichia coli* is a commensal gastrointestinal microbiota bacteria associated with infections in the urinary tract, and strains that produce these enzymes are important pathogens in Veterinary and Human Medicine. Despite the detection of beta-lactamase production being standardized by some committees, such as CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) and BrCAST (Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), the divergences between them generate extreme difficulty in interlaboratory standardization, generating an crucial barrier to the knowledge of the genuine epidemiology of these enzymes. Thus, the present study aimed to evaluate the resistance profile to β -lactams in *Escherichia coli* isolated from urine samples from dogs, cats, and humans with urinary tract infections, in addition to researching - through the disc diffusion technique with interpretive reading, the production of ESBL (Extended Spectrum Beta-lactamase), AmpC and Carbapenemases, comparing the detection methods recommended by the normative documents. The study was carried out with 100 strains of *E. coli* from 273 urine samples from humans, and 97 from 103 samples of 67 dogs and 30 cats, totaling 197 isolates. All isolates had a resistance profile of less than 50% compared to the tested antimicrobials, ampicillin being the least effective, considering both the cutoff points of CLSI and BrCAST. A total of 10% (10/100) and 11.16% (22/197) of *E. coli* from human and animal samples, respectively, were suspected of producing ESBL in the screening test. Among them, 56.25% (18/32) presented suspicion considering the cutoff points of both recommended documents. Of the total of suspected isolates, 81.25% (26/32) were confirmed in the tests - considering at least one normative document. Only 1% (1/100) and 5.15% (5/97) of human and animal samples were AmpC producers, respectively, and among these, four (66.7%, 4/6) were co-producers of ESBL. Finally, two isolates of human origin showed resistance to ertapenem, indicating possible production of carbapenemase. The emergence of multidrug-resistant bacterial strains is worrying due to the aspect of One Health since domestic animals can be reservoirs and transmitting agents for humans and vice versa, where the environment also acts in a potentiating way, contributing significantly to this problem.

KEYWORDS: Antimicrobial Resistance, One Health, *Escherichia coli*, ESBL.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1 Estrutura dos antimicrobianos Betalactâmicos (WILLIAMS, 1999).	7
Figura 2 Classificação molecular e funcional de Betalactamases. Adaptado de Bush, 2013.	8
Figura 3 Testes de triagem e confirmatórios para detecção fenotípica de ESBL, preconizados pelo BrCAST (2020).	10
Figura 4 Testes de triagem e confirmatórios para detecção fenotípica de ESBL, preconizados pelo CLSI (2020).	10
Figura 5 Localização dos discos de antimicrobianos na placa de ágar Müller Hinton para leitura interpretativa.	13
Figura 6 Esquema de triagem e confirmação de ESBL, de acordo com os métodos preconizados pelos documentos CLSI (2020) e BrCAST (2020).	16
Figura 7 Avaliação do brilho verde em cepas de <i>Escherichia coli</i> oriundas de amostras animais semeadas em ágar EMB.	19
Figura 8 Perfil de suscetibilidade de <i>E. coli</i> proveniente de humanos, considerando os pontos de corte do CLSI (2020) e BrCAST (2020).	27
Figura 9 Perfil de suscetibilidade de <i>E. coli</i> proveniente de animais, considerando os pontos de corte do CLSI (2020) e BrCAST (2020).	27
Figura 10 Perfil de resistência das amostras humanas, considerando os pontos de corte do CLSI (2020) e BrCAST (2020).	29
Figura 11. Perfil de resistência das amostras animais, considerando os pontos de corte do CLSI (2020) e BrCAST (2020).	29
Figura 12 Diagrama de Venn apresentando o universo de <i>E. coli</i> suspeitas e positivas para ESBL, considerando as diferentes origens de amostras.	31
Figura 13 Antibiograma realizado por difusão em disco, apresentando sinergismo em disco duplo e positividade no disco combinado, em amostra humana (A) e animal (B).	32

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág
Quadro 1 Informações extraídas do programa Bruker Daltonik MALDI descrevendo o significado dos valores em relação ao score obtido na amostra analisada.	12
Quadro 2 Antimicrobianos utilizados e seus respectivos pontos de corte, segundo o CLSI (2017; 2020).	14
Quadro 3 Antimicrobianos utilizados e seus respectivos pontos de corte, segundo BrCAST (2020).	15

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág
Tabela 1 Antibiotipagem de <i>E. coli</i> , provenientes de amostras humanas, considerando o CLSI (2020).	21
Tabela 2 Antibiotipagem de <i>E. coli</i> , provenientes de amostras humanas, considerando o BrCAST (2020).	22
Tabela 3 Antibiotipagem de <i>E. coli</i> , provenientes de amostras animais, considerando o CLSI (2020).	23
Tabela 4 Antibiotipagem de <i>E. coli</i> , provenientes de amostras animais, considerando o BrCAST (2020).	24
Tabela 5 Suscetibilidade antimicrobiana de <i>E. coli</i> proveniente de humanos, considerando os pontos de corte do CLSI (2020) e BrCAST (2020).	26
Tabela 6 Resultado da triagem de ESBL em cepas de <i>E. coli</i> isoladas humanos e animais, considerando os documentos CLSI (2020) e BrCAST (2020).	30
Tabela 7. Resultado dos testes confirmatórios da produção de ESBL em cepas de <i>E. coli</i> isoladas humanos e animais, considerando os documentos CLSI (2020) e BrCAST (2020).	31
Tabela 8. Perfil de resistência dos isolados de <i>E. coli</i> de humano e animais suspeitos de produzirem AmpC, BrCAST (2020).	33

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AMC - Amoxicilina com ácido clavulânico

AMH - Ágar Muller Hinton

AMP - Ampicilina

ATM - Aztreonam

BrCAST – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

BHI - Brain Heart Infusion

CAZ - Ceftazidima

CCA - Ceftazidima com ácido clavulânico

CCT - Cefotaxima com ácido clavulânico

CEAU - Comissão de Ética no Uso de Animais

CFL - Cefalotina

CFO - Cefoxitina

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

COMEPE - Comissão de Ética na Pesquisa

CPM - Cefepime

CTX - Cefotaxima

EMB - Eosin Methylene Blue Agar

ERT - Ertapenem

ESBL - betalactamasesde Espectro Estendido

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

ExPEC – *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

h - Hora

IMP - Imipenem

ITU - Infecção do trato urinário

LIMM - Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica

MALDI-TOF - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-Flight / Análise proteômica por Tempo de Voo de Ionização - Desorção por Laser Assistida por Matriz

mm – milímetros

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAN-BR. Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única

TSA - Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

UFC - Unidade formadora de colônia

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

UPEC – *Escherichia coli* uropatogênica

VF – Virulence Factor / Fator de virulência

µg – microgramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Infecções do trato urinário	3
2.2 <i>Escherichia coli</i> na patogênese das infecções urinárias	3
2.3 Antibioticoterapia e Resistência antimicrobiana em infecções do trato urinário	4
2.3.1. Betalactamases como mecanismo de resistência em <i>Escherichia coli</i>	6
2.3.1.1. Detecção fenotípica da produção de Betalactamases (CLSI x BrCAST)	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Amostragem	11
3.1.1 <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina de cães e gatos com suspeita de ITU's	11
3.1.2 <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina de humanos com suspeita de ITU's	11
3.2 Identificação fenotípica de <i>Escherichia coli</i>	11
3.2.1 Produção do brilho verde metálico em <i>Escherichia coli</i>	11
3.2.2. Análise proteômica por Tempo de Vôo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF)	12
3.3 Detecção fenotípica de resistência de <i>Escherichia coli</i> aos betalactâmicos	13
3.3.1 Teste de Triagem	13
3.3.2 Confirmação da produção de ESBL por <i>E. coli</i>	16
3.3.2.1 Teste do Disco Combinado – CLSI e BrCAST	16
3.3.2.2 Teste de Sinergismo do Duplo Disco – BrCAST	17
3.3.2.3 Controle de qualidade do teste	17
3.3.3 Detecção de AmpC	17
3.3.3.1 Controle de qualidade do teste	17
3.3.4 Detecção de Carbapenemase	17

3.3.4.1 Controle de qualidade do teste	18
3.4 Análise Estatística	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Identificação das <i>Escherichia coli</i>	19
4.2 Resistência de <i>E.coli</i> proveniente de amostras humanas e animais, aos betalactâmicos, considerando os pontos de corte do CLSI (2020) e BrCAST (2020).	20
4.2.1 Origem humana	25
4.2.2 Origem animal	25
4.3.1 Suspeita da produção de ESBL por <i>E. coli</i> provenientes de amostras humanas e animais, segundo CLSI e BrCAST.	30
4.3.2 Confirmação da produção de ESBL por <i>E. coli</i> provenientes de amostras humanas e animais, segundo CLSI e BrCAST.	30
4.3.3 Detecção de AmpC em <i>E. coli</i> provenientes de amostras humanas e animais	32
4.3.4 Detecção de carbapenemase em <i>E. coli</i> provenientes de amostras humanas e animais	33
5 CONCLUSÕES	35
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
8. ANEXOS	43
8.1 ANEXO A.	43
8.2 ANEXO B.	43
8.3 ANEXO C.	44
8.4 ANEXO D.	44

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana representa um problema mundial e seu aumento tem ocorrido de forma alarmante. Jim O'Neil publicou em 2016 o relatório “*Review on Antimicrobial Resistance*” alertando para a probabilidade de um aumento dos índices globais de resistência antimicrobiana para alarmantes 10 milhões de casos em 2050, com significativos gastos públicos na ordem de US\$100 trilhões. O surgimento de resistência é uma resposta natural evolutiva à exposição antimicrobiana uma vez que ao longo de milhares de anos, fungos e bactérias ambientais desenvolveram mecanismos complexos para evitar a sua destruição. Porém sabe-se que este processo natural pode ser acelerado por fatores como o uso excessivo de antimicrobianos como o emprego de forma indiscriminada na agricultura, pecuária e em outras atividades de produção de proteína animal, além da forma terapêutica e profilática na Medicina Humana e Veterinária. Todas estas práticas aceleram a seleção de bactérias resistentes que são disseminadas no ambiente e podem voltar a contaminar homens e animais, perpetuando um círculo vicioso (HOLMES et al., 2015).

As infecções bacterianas do trato urinário (ITUs) podem ser causadas por bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp., porém as bactérias Gram-negativas, em especial *Escherichia coli*, respondem 75% dos casos em hospedeiros diversos como cães, gatos e também seres humanos. A criação de um ambiente favorável para o desenvolvimento da ITU ocorre devido às alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro e também pela presença de fatores de virulência bacterianos que as tornam mais aptas ao parasitismo. Nos últimos anos, o controle e tratamento das ITU tem sido complicado devido à emergência de cepas bacterianas multirresistentes e tal fato é preocupante também pelo aspecto de Saúde Única, uma vez que os animais domésticos podem ser importantes reservatórios e agentes transmissores de tais bactérias para os seres humanos (PITOUT 2012, GUARDABASSI et al. 2004, GIBSON et al. 2008) (apud CARVALHO et al. 2014).

Dentre o grupo das bactérias Gram-negativas, destaca-se a ordem Enterobacteriales cujas espécie *Escherichia coli* é a prevalente e pode estar associadas a diversos tipos de infecções as infecções no trato urinário (ITU) de humanos, cães e gatos (KAPER et al., 2004).

A classe mais prescrita para o tratamento de infecções causadas por enterobactérias é a dos betalactâmicos, devido a sua baixa toxicidade. A resistência a estes antimicrobianos pode ser decorrente de diversos mecanismos, como a redução da permeabilidade ao fármaco pela perda ou redução na expressão de porinas, pela hiperexpressão de bombas de efluxo e pela produção de enzimas que inativam o fármaco, chamadas betalactamases (COQUE et al., 2008).

Em bactérias Gram-negativas, a resistência antimicrobiana, apresenta uma grande variedade de padrões relacionados à resistência natural bem como à resistência adquirida pela veiculação de genes intraespecíficos ou provenientes de espécies e gêneros diferentes (SANTIAGO, 2013).

A produção de betalactamases que conferem resistência às penicilinas, mas não às cefalosporinas de amplo espectro, é um dos principais mecanismos encontrados dentre os membros da ordem Enterobacteriales, que podem produzir betalactamases de espectro estendido classificadas filogeneticamente como “*Serina-Beta-Lactamases*” ou “*Metallo-Beta-Lactamases*”, formando dois grandes grupos de enzimas que possuem a capacidade de degradar betalactâmicos. Dois esquemas são comumente utilizados para a classificação das betalactamases; a classificação molecular de Ambler (AMBLER, 1980) e a classificação funcional proposta por Bush, inicialmente em 1989, e ampliada por Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH et al., 1995; BUSH & JACOBY, 2010) (apud SANTIAGO, 2013).

Em fevereiro de 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a primeira lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antimicrobianos apresentando 12 famílias de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde humana, classificando-as

em três níveis: crítico, alto e médio. A lista foi elaborada numa tentativa de enfrentar a crescente resistência global aos antimicrobianos e destaca em particular, a ameaça de bactérias Gram-negativas resistentes a múltiplos antimicrobianos como as Enterobacteriales produtoras de ESBL e carbapenemases, classificadas como nível crítico de importância. Seguindo esta tendência mundial de preocupação, o Ministério da Saúde publicou em dezembro de 2018 o “Plano Nacional de Controle de Resistência Antimicrobiana no Âmbito da Saúde Única” (PAN-BR) que apresenta 12 objetivos, sendo um deles a “Construção e estabelecimento de um sistema nacional de vigilância e monitoramento integrado desta resistência.” Para tal, é necessário que os laboratórios de pesquisa e de análises clínicas, atuem de forma uniforme na execução das técnicas de detecção da resistência, uma vez que a padronização é essencial para o estabelecimento dos dados epidemiológicos reais.

Até o ano de 2018, os laboratórios utilizavam os documentos normativos do comitê americano CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) como referência para os pontos de corte e quais antimicrobianos deveriam ser utilizados para análise da resistência antimicrobiana. Porém, em dezembro de 2018, através da Portaria de nº64 do Ministério da Saúde, foi preconizado que todos os laboratórios da rede pública e privada, de todas as Unidades Federais, deveriam implementar o sistema BrCAST (*Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), que tem como base o EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), porém muitos laboratórios ainda continuam a utilizar os documentos americanos. Apesar da detecção da produção de betalactamase do tipo ESBL ser padronizada por estes comitês, as divergências entre os documentos geram extrema dificuldade na padronização interlaboratorial dos testes, ocasionando em uma importante barreira ao conhecimento da real prevalência e epidemiologia dessa enzima. O CLSI, por exemplo, preconiza o método de discos combinados para detecção de ESBL, enquanto o BrCAST preconiza o método de discos combinados ou sinergismo de disco duplo, porém estes documentos apresentam diferentes concentrações dos discos a serem testados e também há diferenças no diâmetro dos halos (CLSI, 2020) (BRCAST, 2020). E um fato é que as análises desta detecção são muito abundantes na Medicina Humana e pouco são exploradas na Medicina Veterinária, como se ambas pudessem ser analisadas de forma separada e excluindo assim toda importância do conceito de One Health.

Frente a toda esta problemática da produção de betalactamases em *E. coli* circulando em ambiente animal bem como a necessidade de uma padronização efetiva para a detecção desta resistência em Medicina Veterinária, o presente trabalho objetiva identificar cepas de *E. coli* oriundas de amostras de urina previamente coletadas de cães e gatos admitidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Rio de Janeiro e de humanos provenientes de um Laboratório Ambulatorial, com suspeita de ITU. Tais bactérias foram avaliadas quanto à resistência aos betalactâmicos e foi realizado uma comparação do perfil fenotípico expresso pelas cepas utilizando os métodos de detecção de ESBL, preconizados pelo CLSI M100 (2020) e BrCAST (2020).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções do trato urinário

A infecção do trato urinário (ITU) refere-se a presença e a reprodução de microrganismos na urina, podendo invadir e refletir nas estruturas tubulares ou parenquimatosas ou órgãos anexos. Pode ser dividida em: infecção do trato urinário inferior, cistite, no qual a presença de bactérias é limitada a bexiga, e em ITU superior, afetando pelve e parênquima renal, definida como pielonefrite (CORREA et al., 2006)

Vários fatores são considerados predisponentes à infecção em seres humanos, como a ocorrência de estase urinária, gravidez, diabetes, obstrução do trato urinário, hábitos de higiene, inserção de corpo estranho, menopausa, doenças neurológicas e doenças sexualmente transmissíveis. Os principais sintomas são a disúria, polaciúria, ardor ao urinar, urgência miccional, urina com cheiro fétido, alterações na cor, dificuldade de iniciar a micção, eliminação de sangue na urina, dor na parte inferior do abdômen, febre, calafrios, dor lombar, náuseas e vômitos (RODRIGUES E BARROSO, 2011).

Infecções do Trato Urinário em cães são geralmente associadas à vesícula urinária, podendo em alguns casos, envolver os rins. Correspondem a uma estimativa de 10% dos pacientes caninos dos atendimentos clínicos veterinários e, alguns estudos concluíram que as fêmeas e idosos são potenciais grupos de risco para essa doença (ETŪN et al., 2003). Estimativas indicam que número elevado de cães irá desenvolver esta afecção em alguma fase da vida, sendo esta majoritariamente de origem bacteriana (BLANCO & BARTGES 2001, JOHNSON et al. 2003) Relata-se uma frequência de 5 a 17% de ITU nos cães e no universo das doenças infecciosas que acomete a espécie canina, a ITU representa de 2 a 3% (KOGIKA & WAKI, 2015). Nos felinos, a cistite inflamatória, não infecciosa, é o que predomina, observado em 1 a 3% dos gatos com manifestação clínica do trato urinário inferior (WHITE et al., 2012). A baixa frequência da infecção urinária bacteriana em gatos pode estar relacionada a mecanismos locais de defesa, como a capacidade dos felinos de produzir uma urina altamente concentrada e ao consumo de dietas ricas em proteínas, que proporciona a formação de urina naturalmente ácida e altamente concentrada em ureia (BARTGES 2004, BARSANTI 2006, THOMPSON et al. 2011). (apud CARVALHO et al. 2014).

Em humanos, as ITUs ocorrem em homens e mulheres das mais variadas idades, porém os grupos mais frequentemente acometidos são recém-nascidos do sexo masculino, homens com obstrução prostática, idosos de ambos os sexos e, em especial, mulheres jovens sexualmente ativas (BRAOIOS et al., 2009).

2.2 *Escherichia coli* na patogênese das infecções urinárias

Os agentes causadores mais comuns das infecções urinárias são os membros da ordem *Enterobacterales*, entre eles principalmente *Escherichia coli* com prevalência entre 35-70% em animais de companhia e 75-95% em humanos. *E. coli* capaz de causar ITU é denominada *E. coli* uropatogênica (UPEC). As UPECs pertencem à *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC), que são filogeneticamente e epidemiologicamente distintas da comensal (LONCARIC et al., 2020).

A *Escherichia coli* habita o intestino grosso de humanos saudáveis e outros animais de sangue quente, mas em alguns casos, pode causar infecções extraintestinais (ExPEC). Esta bactéria pode facilmente adquirir fatores de virulência (VFs) e elementos genéticos móveis. Os isolados de ExPEC são altamente complexos e possuem uma variedade de VFs e podem pertencer a diferentes

linhagens filogenéticas. Essas cepas causam infecções complicadas do trato urinário, bacteremia e sepse (REZATOFIHI et al. 2021).

A infecção do trato urinário começa com bactérias, como *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC), colonizando as partes distais da uretra, ascendendo à bexiga, aderindo à superfície da bexiga e formando um biofilme, que então invade e se replica na célula hospedeira. A capacidade da UPEC de causar ITU, está relacionada tanto as características estruturais quanto aos secretados. Traços estruturais associados à virulência, incluindo adesinas, fímbrias, flagelo e outros componentes da superfície estão envolvidos na colonização das superfícies mucosas no trato urinário, enquanto componentes secretados, como toxinas e enzimas, são responsáveis por danos celulares. As ITUs podem variar de uma bacteriúria leve a sepse grave, e antimicrobianos são frequentemente necessários para curar a infecção (BUBERG et al., 2021)

Nos últimos anos, o controle e tratamento das ITU têm sido complicados devido à emergência de cepas bacterianas multirresistentes e tal fato é preocupante também pelo aspecto de Saúde Única uma vez que os animais domésticos podem ser importantes reservatórios e agentes transmissores de tais bactérias para os seres humanos (PITOUT 2012, GUARDABASSI et al. 2004, GIBSON et al. 2008) (*apud* CARVALHO et al. 2014).

2.3 Antibioticoterapia e Resistência antimicrobiana em infecções do trato urinário

A resistência aos antimicrobianos apresenta um problema de saúde pública mundial e seu aumento tem ocorrido de forma alarmante, sendo estimado que, o uso de fármacos para o tratamento de infecções possa resultar em perda de efetividade (WHO, 2007). Estima-se que 700 mil mortes sejam causadas anualmente pela resistência aos antimicrobianos. De acordo com essas análises, sem uma mudança de abordagem para conter o problema, até 2050, a AMR poderá causar mais mortes que o câncer. De acordo com o economista britânico Jim O'Neill, até 2050, dez milhões de óbitos anuais serão atribuídos à resistência antimicrobiana. Segundo o mesmo estudo, o impacto para a economia global será de aproximadamente cem trilhões de dólares (ESTRELA, 2018).

A OMS fez uma análise do panorama da resistência antimicrobiana mundial e constatou, que poucos países possuíam planos nacionais multissetoriais sobre AMR e que o monitoramento, quase inexistente, era pulverizado e não sistemático. Alguns países reportaram, ainda, facilidade no acesso da população aos antimicrobianos, ausência de medidas de restrição e controle de receituário e inexistência de programas de prevenção e controle de infecção hospitalar, medidas importantes na prevenção da AMR. Diante desse cenário, a OMS em parceria com a FAO e a OIE, lançou o “Plano de Ação Global para o Enfrentamento à Resistência aos Antimicrobianos”. No qual tem como principal objetivo assegurar a continuidade da resposta no tratamento e prevenção de doenças infecciosas por meio de medicamentos efetivos e seguros de forma acessível, responsável e que priorize a abordagem de Saúde Única. Os objetivos estratégicos do “Plano de Ação Global” visavam ampliar o estado de atenção e promover mais conhecimento sobre a AMR, fortalecer a vigilância epidemiológica, reduzir a incidência de infecções, otimizar o uso de medicamentos antimicrobianos na saúde humana e animal e garantir investimento sustentável para sua implementação. Baseado no lançamento e nas discussões geradas pelo Plano Global, o Brasil elaborou o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (PAN-BR) (ESTRELA, 2018). O documento apresenta 12 objetivos principais abordando diferentes pontos chave no combate à resistência antimicrobiana considerando as responsabilidades dos diferentes setores envolvidos. Dentre estes objetivos está o “Aprimoramento e ampliação do conhecimento sobre resistência antimicrobiana por meio da realização de estudos científicos” que visa estabelecer o apoio governamental à pesquisa em resistência antimicrobiana de modo a fomentar a produção de dados que possam ser utilizados para outro objetivo estratégico do plano que é a “Construção e estabelecimento de um sistema nacional de vigilância e monitoramento integrado desta resistência.”

A descoberta dos antibióticos foi um grande avanço para a aplicação terapêutica tanto na medicina humana quanto na veterinária. Porém, a pressão seletiva positiva, a qual os microrganismos têm sido expostos, tem feito com que eles desenvolvam mecanismos de proteção (MOTA et al., 2005). Segundo Fuchs (2004), a resistência bacteriana do tipo primário é apresentada por espécies naturalmente resistentes aos antimicrobianos. E a adquirida consiste em um fenômeno genético relacionado à existência de genes contidos em microrganismos que codificam diferentes mecanismos bioquímicos, impedindo a ação de diversos fármacos (FRERE, 1995; KAYE et al., 2000).

A resistência natural das bactérias é uma característica intrínseca que ocorre sem uma exposição prévia ao antimicrobiano. O grande número de espécies dentro da família das enterobactérias acarreta uma elevada variedade de padrões de sensibilidade natural (RISUEÑO et al., 2002). O conhecimento da resistência intrínseca das diferentes espécies auxilia na escolha das estratégias de tratamento empírico (RIVERÓN et al., 2003; RICE & BONOMO, 2005). Dentre as formas de resistência natural em Gram negativos estão aquelas em que o antimicrobiano não atua no alvo por não penetrar a célula - por motivos de impermeabilidade da membrana externa ao tamanho da molécula ou pela característica hidrofílica – e/ou tamanho das proteínas da membrana externa, denominadas porinas (FLUIT et al., 2001; BRASIL, 2007; BOERLIN & WHITE, 2010). Dentre os mecanismos mais comuns de resistência natural, destaca-se:

- resistência intrínseca a MLS (macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas) que ocorre devido a uma baixa permeabilidade da membrana externa dos compostos hidrofóbicos (FLUIT et al., 2001);
- impermeabilidade da membrana plasmática aos macrolídeos devido ao seu tamanho molecular (BOERLIN & WHITE, 2010);
- permeabilidade limitada da membrana plasmática responsável pela resistência à penicilina, eritromicina, clindamicina e vancomicina (BRASIL, 2007).

Já a resistência adquirida é aquela na qual o microrganismo necessita de exposição prévia ao antimicrobiano para desenvolver mecanismos para burlar a ação dos medicamentos (MADIGAN et al., 2010). O desenvolvimento da resistência em uma bactéria ocorre por meio de mutações ou por aquisição de material genético extracromossômico proveniente de outras bactérias. Quando ocorre mutação, a bactéria pode adquirir resistência cromossômica por meio da alteração ou superprodução do alvo, por mudanças na síntese de proteínas ligadas à permeabilidade alterando a entrada e o acúmulo da droga dentro da célula ou dificultando o encontro do fármaco com o seu alvo (MOTA et al., 2005). Em caso de resistência por aquisição de material genético, a transferência de genes ocorre horizontalmente por meio de plasmídeos ou outro material genético móvel, como integrons e transposons. Desta maneira, uma bactéria pode adquirir a resistência a um ou a vários antimicrobianos sem a necessidade de ter sido exposto a este fármaco (RIVERÓN et al., 2003). Tendo em vista os vários mecanismos de resistência aos fármacos utilizados atualmente, a comunidade científica e médica vem procurando por alternativas e novas estratégias para combater bactérias resistentes (SILVEIRA et al., 2006).

A disseminação da resistência antimicrobiana não respeita fronteiras filogenéticas ou ecológicas. A transmissão do animal para o homem pode ocorrer por vários meios, incluindo suprimentos de alimentos e água, bem como contato direto com animais e fezes. Genes de resistência podem ser transferidos entre bactérias que pertencem a espécies não relacionadas e originam distintos nichos ecológicos. Elementos genéticos móveis albergando genes de resistência podem com facilidade ser transferidos horizontalmente entre bactérias de animais terrestres, peixes, aves domésticas e silvestres e humanos. Além disso, genes de resistência e bactérias resistentes podem se disseminar através das fronteiras geográficas pelo movimento de pessoas, animais, alimentos. Isso implica que o uso de antimicrobianos em animais tem consequências para a situação da resistência em humanos, e os problemas de resistência em um país podem se expandir para outros. A resistência antimicrobiana seja em ambientes humanos ou não está correlacionada em escala global. Assim, ao centrar-se nos problemas de resistência antimicrobiana, deve-se ter

uma visão global e holística, que envolva diferentes setores e nichos ecológicos (GUARDABASSI & COURVALIN, 2006).

As principais orientações para prevenção e tratamento das infecções do trato urinário incluem aumento da ingestão de água, cuidados de higiene, correção anatômica e uso de antimicrobianos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a antibioticoterapia deveria ser iniciada após a cultura bacteriana e seu respectivo antibiograma liberado pelo laboratório de patologia clínica. Porém na prática clínica isso não acontece, sendo o paciente tratado empiricamente (RODRIGUES E BARROSO, 2011). Para ITU descomplicada os antimicrobianos de "primeira linha" sugeridos incluem, amoxicilina, cefalexina ou trimetoprim-sulfametoxazol. O uso de betalactâmicos, fluoroquinolonas ou cefalexina de espectro estendido é inadequado para a maioria das UTIs descomplicadas e deve ser reservado para infecções complicadas ou resistentes. (OLIN & BARTHES, 2015). No entanto, o aumento da resistência aos antimicrobianos e a alta taxa de recorrência podem aumentar a carga dessas infecções comuns na sociedade (MEIRELES et al. 2015).

2.3.1. Betalactamases como mecanismo de resistência em *Escherichia coli*

A classe dos antimicrobianos betalactâmicos é constituída por penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (figura 1) (SOUSA et al., 1998). Estes fármacos estão entre os mais prescritos em todo o mundo devido a sua baixa toxicidade e constituem as principais escolhas terapêuticas para o tratamento de infecções causadas pelos gêneros da família Enterobacteriaceae juntamente às fluoroquinolonas (LIVERMORE, 1995; COQUE et al., 2008).

Os antimicrobianos betalactâmicos inativam um conjunto de transpeptidases que catalisam ligações cruzadas na fase final de síntese do peptidoglicano (KASMAR & HOOPER, 2009). A classe dos betalactâmicos contém o núcleo principal sendo um anel betalactâmico ligado a um radical.

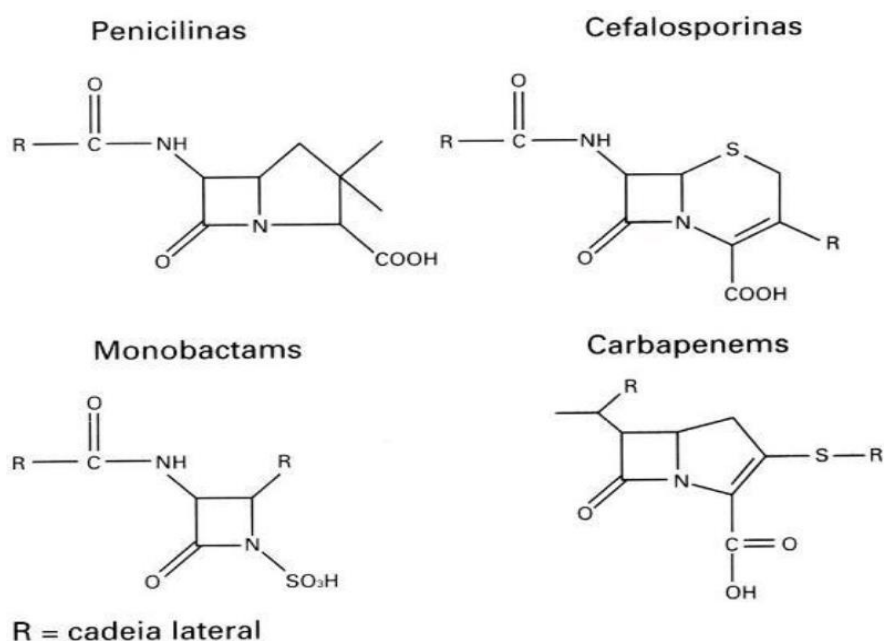


Figura 1: Estrutura dos antimicrobianos Betalactâmicos (WILLIAMS, 1999).

O radical é a parte que os diferencia em penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, sendo esse último destituído de radical ligado ao núcleo betalactâmico. Apenas são ativos contra bactérias em crescimento e são desprovidos de qualquer atividade contra bactérias sem parede (NOGUEIRA, 2011). A resistência aos betalactâmicos apresentada por espécies desta família pode ser decorrente de diversos mecanismos, como a redução da permeabilidade ao fármaco pela perda ou redução na expressão de porinas, pela hiperexpressão de bombas de efluxo e pela produção de enzimas que inativam o fármaco, chamadas betalactamases (GUPTA et al., 2006; PEREZ et al., 2007).

A resistência aos betalactâmicos também dependerá da quantidade de enzima produzida, da habilidade em hidrolisar o antimicrobiano e da velocidade com que o betalactâmico penetra pela membrana externa (BRADFORD, 2001; SOUSA Jr et al., 2004). As betalactamases são enzimas capazes de catalisar a hidrólise do anel β -lactâmico através da hidroxilação irreversível da ligação amida do anel β -lactâmico, gerando compostos sem atividade antimicrobiana. Estas enzimas são armazenadas no espaço periplasmático das bactérias Gram-negativas (LIVERMORE, 1995; SANTOS, 2006).

A atividade de hidrólise do β -lactâmico pode variar de acordo com o tipo de substrato bem como com a suscetibilidade aos inibidores de betalactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (BUSH, 2001; SOUSA Jr et al., 2004). A produção de betalactamases é o mais importante mecanismo de resistência contra agentes betalactâmicos encontrado em bactérias Gram-negativas.

O surgimento da resistência aos antimicrobianos betalactâmicos foi relatado antes da penicilina ser desenvolvida. A primeira betalactamase foi identificada em *Escherichia coli* antes da liberação da penicilina para uso na prática médica (BRADFORD, 2001).

As betalactamases são classificadas filogeneticamente como “*Serina-Betalactamases*” ou “*Metallo-Betalactamases*”, formando dois grandes grupos de enzimas que possuem a capacidade de degradar betalactâmicos. Dois esquemas são comumente utilizados para a classificação das betalactamases; a classificação molecular de Ambler (AMBLER, 1980) e a classificação funcional proposta por Bush, inicialmente em 1989, e ampliada por Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH et al., 1995; BUSH & JACOBY, 2010) (*apud* SANTIAGO, 2013). A primeira baseia-se na homologia de aminoácidos entre as enzimas, e reconhece quatro classes, designadas de A a D. As classes A, C e D são enzimas que contêm serina em seu sítio ativo; a classe B é representada pelas metaloenzimas, contendo zinco no sítio ativo. Já a classificação de Bush-Jacoby-Medeiros baseia-se na similaridade entre os perfis de substratos e inibidores das betalactamases, classificando as enzimas de 1 a 4, com subdivisões e é considerada de mais utilidade em estudos microbiológicos (TOLENTINO, 2009) (*apud* SANTIAGO, 2013).

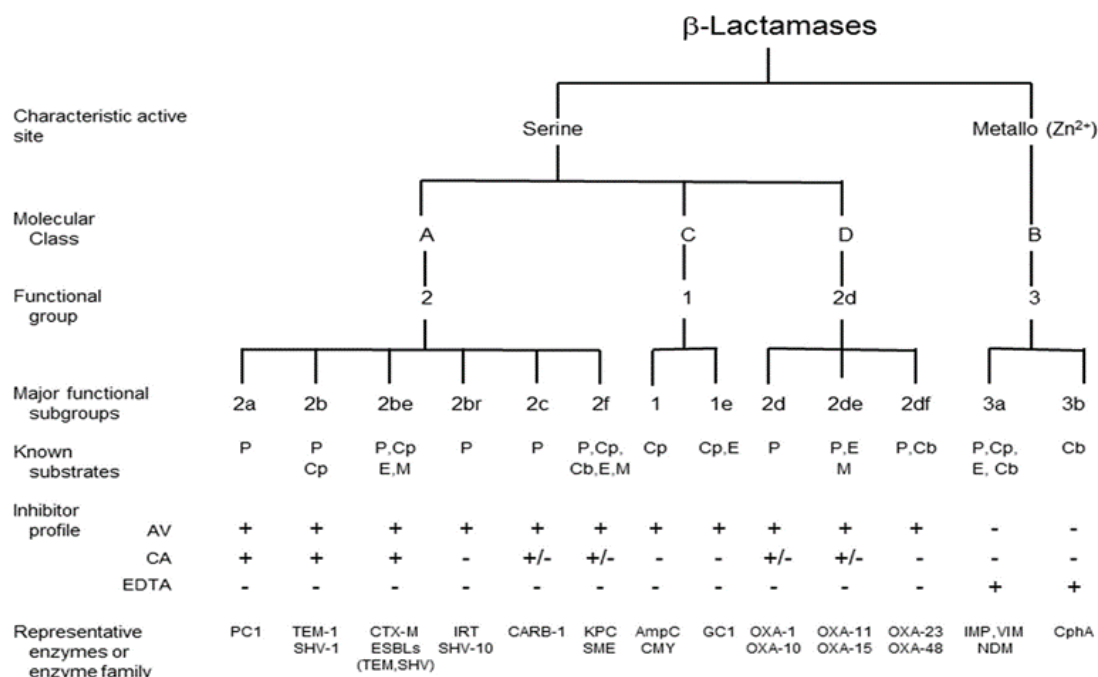


Figura 2. Classificação molecular e funcional de Betalactamases. CLA, ácido clavulânico; AVI, avibactam; APB, ácido fenilborônico; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético. Antimicrobianos: Cb, carbapenêmico; Cf, cefalosporina; Cfe, cefalosporina de espectro estendido; M, monobactâmico; P, penicilina. Adaptado de Bush, 2013.

Algumas enterobactérias produzem betalactamases de amplo espectro (ESBL) como TEM, SHV, CTX-M que podem ser classificadas em diversos grupos dependendo da estrutura molecular e substrato de atuação e também podem produzir enzimas capazes de hidrolizar carbapenêmicos (carbapenemases). De acordo com a classificação existente, as carbapenemases pertencem às classes moleculares A (KPC), B (metalobetalactamase, das quais VIM, IMP e NDM são os principais tipos) e D (oxacillinase - representada pelo tipo OXA) (DEL FRANCO et al., 2016).

Em fevereiro de 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a primeira lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antimicrobianos apresentando 12 famílias de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde humana, classificando-as em três níveis: crítico, alto e médio. A lista foi elaborada na tentativa de enfrentar a crescente resistência global aos antimicrobianos e destaca em particular, a ameaça de bactérias Gram-negativas resistentes a múltiplos antimicrobianos como as enterobactérias produtoras de ESBL e carbapenemases, classificadas como nível crítico de importância. Seguindo esta tendência mundial de preocupação, o Ministério da Saúde publicou em dezembro de 2018 o “Plano Nacional de Controle de Resistência Antimicrobiana no Âmbito da Saúde Única” (PAN-BR), em convergência com os objetivos definidos pela aliança tripartite entre a OMS, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Acredita-se que estes dados obtidos servirão de base para o norteio de outros objetivos do plano como a promoção do uso racional de antimicrobianos no âmbito da saúde humana e agropecuária além de auxiliar na redução da incidência de infecções com medidas eficazes de prevenção e controle nos serviços de saúde e fortalecimento da implantação de medidas de prevenção e controle de infecções no âmbito da agropecuária. Ademais uma outra preocupação destes documentos é a difusão do conhecimento à comunidade através de informações educativas (PAN-BR,2018).

2.3.1.1. Detecção fenotípica da produção de Betalactamases (CLSI x BrCAST)

A detecção fenotípica da produção de betalactamases deve ser executada através do teste de antibiograma, sendo realizado conforme as recomendações dos documentos especializados. A difusão em disco, com leitura interpretativa considerando disco aproximação, bem como a microdiluição em caldo são as metodologias padronizadas pelo Ministério da Saúde no Brasil e até o ano passado, os laboratórios utilizavam o sistema CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) como referência para os pontos de corte e quais antimicrobianos deveriam ser utilizados. Porém, em dezembro de 2018, através da Portaria de nº64, foi preconizado que todos os laboratórios da rede pública e privada, de todas as Unidades Federais, deveriam implementar o sistema BrCAST (Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), que tem como base o EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) até dezembro de 2019 (ANVISA, 2020).

Uma vez que esta medida foi implementada há pouco tempo e muitos laboratórios ainda não estão acostumados a utilizar os documentos disponíveis no site do BrCAST (www.BrCAST.org.br) ou não conseguem adquirir os discos de antimicrobianos e painéis nas concentrações preconizadas pelos documentos brasileiros, os mesmos continuam a utilizar a preconização do CLSI. E como existem divergências entre os documentos, no que tange concentração de antimicrobianos e pontos de corte, as divergências entre os dados podem gerar dificuldade na padronização interlaboratorial dos testes, ocasionando em um importante barreira ao conhecimento da real prevalência e epidemiologia da disseminação de bactérias multirresistentes (CLSI, 2020) (BrCAST,2020).

O BrCAST preconiza um método de triagem considerando disco difusão ou microdiluição em caldo (figura 2). Nestes métodos de triagem, o documento estabelece concentrações de antimicrobianos diferentes às preconizadas nos testes confirmatórios, sendo eles: sinergismo de disco duplo, método de discos combinados, E-Test e microdiluição em caldo. O CLSI (figura 3), determina o método de triagem, também considerando disco difusão ou microdiluição em caldo, avaliando a resistência à cefpodoxima ou ceftazidima ou aztreonam ou cefotaxima ou ceftriaxona, podendo indicar a produção de ESBL, que deve ser confirmada pelo método de disco combinado e/ou microdiluição em caldo. Ambos os documentos apresentam diferentes concentrações dos discos a serem testados e também há diferenças no diâmetro dos halos (CLSI, 2020, BRCAST, 2020).

Outra diferença é que apenas o CLSI define como Sensível Dose dependente (SDD), para aquelas concentrações dependentes do regime de dose. O BrCAST define a Área de Incerteza Técnica (AIT). Esta área corresponde a um valor de CIM e/ou intervalo de halo de inibição no qual a categorização é incerta. Ademais, o CLSI se baseia em distribuições CIM, propriedade farmacocinéticas-farmacodinâmicas (PK-PD) e os mecanismos de resistência. Enquanto, o BrCAST baseia seus pontos clínicos de cortes epidemiológicos em CIM (ECOFFS) e PK-PD. Todos os documentos sobre distribuições CIM e os ECOFFS estão disponíveis gratuitamente no site da EUCAST e BrCAST, já o acesso ao CLSI, só é possível através da compra do documento (KASSIM et al., 2016)

Tabela 1. Métodos de triagem para detecção de ESBL em *Enterobacteriaceae* (13-19).

Método	Antibiótico	Realizar teste para ESBL se
Diluição em caldo ou ágar ¹	Cefotaxima/ceftriaxona E ceftazidima	CIM >1 mg/L para qualquer um dos antimicrobianos
	Cefpodoxima	CIM >1 mg/L
Disco-difusão ¹	Cefotaxima (5 µg) ou Ceftriaxona (30 µg) E ceftazidima (10 µg)	Halo de inibição < 21 mm Halo de inibição < 23 mm Halo de inibição < 22 mm
	Cefpodoxima (10 µg)	Halo de inibição < 21 mm

¹ Em todos os métodos testar cefotaxima ou ceftriaxona E ceftazidima OU testar cefpodoxima isoladamente.

Tabela 2. Testes confirmatórios para ESBL em *Enterobacteriaceae* que são positivos nos testes de triagem para ESBL (ver Tabela 1). Grupo 1 de *Enterobacteriaceae* (ver Figura 1).

Método	Agente antimicrobiano (conteúdo do disco)	A confirmação de ESBL é positiva se
Teste de gradiente para ESBL	Cefotaxima +/- ácido clavulânico	A razão de CIMs for ≥ 8 ou se houver deformação da elipse
	Ceftazidima +/- ácido clavulânico	A razão de CIMs for ≥ 8 ou se houver deformação da elipse
Teste de disco-difusão combinado (TDC)	Cefotaxima (30 µg) +/- ácido clavulânico (10 µg)	Aumento no halo de inibição ≥ 5 mm
	Ceftazidima (30 µg) +/- ácido clavulânico (10 µg)	Aumento no halo de inibição ≥ 5 mm
Microdiluição em caldo	Cefotaxima +/- ácido clavulânico (4 mg/L)	Razão entre CIMs ≥ 8
	Ceftazidima +/- ácido clavulânico (4 mg/L)	Razão entre CIMs ≥ 8
	Cefepima +/- ácido clavulânico (4 mg/L)	Razão entre CIMs ≥ 8
Teste de sinergismo do duplo disco (TSDD)	Cefotaxima, ceftazidima e cefepima	Expansão do halo de inibição da cefalosporina indicadora em direção ao disco de amoxicilina-ácido clavulânico

Figura 3. Testes de triagem e confirmatórios para detecção fenotípica de ESBL, preconizados pelo BrCAST (2020).

Test	Criteria for Performance of ESBL Test		ESBL Test	
	Disk diffusion	Broth microdilution	Disk diffusion	Broth microdilution
Test method	MHA	CAMHB	MHA	CAMHB
Medium	MHA	CAMHB	MHA	CAMHB
Antimicrobial concentration	For <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , and <i>E. coli</i> : Cefpodoxime 10 µg or Ceftazidime 30 µg or Aztreonam 30 µg or Cefotaxime 30 µg or Ceftriaxone 30 µg For <i>P. mirabilis</i> : Cefpodoxime 10 µg or Ceftazidime 30 µg or Cefotaxime 30 µg (Using more than one antimicrobial agent improves the sensitivity of ESBL detection.)	For <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , and <i>E. coli</i> : Cefpodoxime 4 µg/mL or Ceftazidime 1 µg/mL or Aztreonam 1 µg/mL or Cefotaxime 1 µg/mL or Ceftriaxone 1 µg/mL For <i>P. mirabilis</i> : Cefpodoxime 1 µg/mL or Ceftazidime 1 µg/mL or Cefotaxime 1 µg/mL (Using more than one antimicrobial agent improves the sensitivity of ESBL detection.)	Ceftazidime 30 µg Ceftazidime-clavulanate ^a 30/10 µg and Cefotaxime 30 µg Cefotaxime-clavulanate 30/10 µg (Testing necessitates using both cefotaxime and ceftazidime, alone and in combination with clavulanate.)	Ceftazidime 0.25–128 µg/mL Ceftazidime-clavulanate 0.25/4–128/4 µg/mL and Cefotaxime 0.25–64 µg/mL Cefotaxime-clavulanate 0.25/4–64/4 µg/mL (Testing necessitates using both cefotaxime and ceftazidime, alone and in combination with clavulanate.)
Inoculum	Standard disk diffusion procedure	Standard broth dilution procedure	Standard disk diffusion procedure	Standard broth dilution procedure
Incubation conditions	35°C ± 2°C; ambient air	35°C ± 2°C; ambient air	35°C ± 2°C; ambient air	35°C ± 2°C; ambient air
Incubation length	16–18 hours	16–20 hours	16–18 hours	16–20 hours

Figura 4. Testes de triagem e confirmatórios para detecção fenotípica de ESBL, preconizados pelo CLSI (2020).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

3.1.1 *Escherichia coli* isoladas de urina de cães e gatos com suspeita de ITU's

Foram selecionados 103 isolados de *Escherichia coli*, sendo 72 de espécie canina e 31 felina, previamente identificados por métodos bioquímicos, provenientes de amostras de urina de cães e gatos com suspeita de infecções no trato urinário, obtidas na Residência em Diagnóstico Microbiológico Veterinário - UFRRJ, no período de 2015 a 2020. Os isolados congelados em caldo BHI (Brain Heart Infusion) com glicerol (45%) a -20°C foram reativados em ágar BHI e posteriormente semeadas em ágar seletivo EMB (Eosin Methylene Blue Agar), sendo incubadas na estufa a 35°C +/- 2 °C por 24 horas para o crescimento bacteriano. As cepas reativadas foram estocadas em caldo BHI com glicerol (45%) a -20°C para análises posteriores. Este projeto foi aprovado pela CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da UFRRJ, número 6967290616, assim como pela Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ (COMEP-UFRRJ) número 006830.

3.1.2 *Escherichia coli* isoladas de urina de humanos com suspeita de ITU's

Foram obtidas 273 amostras de urina, totalizando 157 isolados bacterianos, a partir de uma parceria com laboratório de análises clínicas Lab Gelson, situado na cidade de Mendes – RJ, durante o segundo semestre de 2019 e primeiro semestre de 2020. As urinas foram semeadas em ágar seletivo EMB e as placas foram incubadas na estufa a 35°C +/- 2 °C por 24 horas. As amostras que apresentaram crescimento satisfatório, foram estocadas em caldo BHI com glicerol (45%) a -20°C para análises posteriores. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Pesquisa (COMEP) da UFRRJ, número 340/2021.

3.2 Identificação fenotípica de *Escherichia coli*

Todas as placas de EMB foram incubadas por 24h a 48h em 35°C +/- 2 °C o crescimento colonial no meio foi avaliado com relação à expressão do fenômeno de produção do brilho verde metálico sugestivo de *Escherichia coli*, além de análises fenotípicas da colônia. A técnica de Gram foi realizada e independente da produção do brilho verde metálico, todas as colônias de bastonetes Gram negativos foram enviadas ao L IMM (Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica), Instituto de Microbiologia Paulo Góes da UFRJ para execução da técnica proteômica MALDI-TOF (Tempo de Voo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz).

3.2.1 Produção do brilho verde metálico em *Escherichia coli*

A identificação de *Escherichia coli* passa por algumas metodologias padronizadas internacionalmente para enterobactérias e, segundo Koneman et al. (2018), o ágar EMB (Eosin Methylene Blue) é um meio de cultura favorável ao crescimento e diferencial desta espécie bacteriana. Este meio é classificado como meio diferencial e seletivo. Contém eosina azul de metileno em sua formulação, que inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e é um indicador diferencial para a fermentação da lactose e da sacarose. O aspecto morfológico característico de *E. coli* neste meio são grandes colônias preto-azuladas com um brilho verde

metálico, às vezes apresentando colônias com um centro roxo e sem a produção de brilho verde metálico ou mesmo colônias negativas para lactose rosa (BBL® EMB Manual).

Os isolados de origem humana e animal foram semeados em ágar EMB, e incubados por 24h a 48h em 35°C +/- 2 °C para avaliação da expressão do fenômeno de produção do brilho verde metálico em *Escherichia coli*.

3.2.2. Análise proteômica por Tempo de Voo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF)

As cepas bacterianas foram submetidas à técnica de MALDI-TOF, no qual utiliza a espectrometria de massa como fonte de ionização e desorção a laser assistida por matriz - MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) e o analisador de massas do tipo tempo-de-voe-TOF (Time-of-Flight), que permite a comparação do espectro de massas de um microrganismo isolado com os espectros de referência de cepas conhecidas, possibilitando a classificação e identificação do patógeno com mais rapidez do que os métodos convencionais (CHERKAOUI et al. 2010, ANGELETTI 2016) (*apud* BIER et al., 2017).

Cada cultura bacteriana foi transferida para a microplaca (96 MSP, Bruker – Billerica, EUA) e, ao sedimento bacteriano, foi adicionada uma solução de lise (ácido fórmico 70%, Sigma-Aldrich®) em quantidade suficiente para cobri-lo. Em seguida, 1 µL de solução da matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 2,5%, Sigma-Aldrich®) foi utilizado para cobrir o extrato bacteriano, para finalmente ser processado. Os espectros de cada amostra foram gerados em um espectrômetro de massa (MALDI-TOF LT Microflex Bruker, Bruker®) equipado com laser de 337nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa FlexControl 3.3 (Bruker®). Os espectros foram coletados na faixa de massa entre 2.000 e 20.000 m/s e, posteriormente, analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker®), com as configurações padronizadas para identificação bacteriana. O programa confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência em um banco de dados. Os resultados obtidos variam em uma escala que vai de zero a três, conforme mostra a Quadro 1, sendo que quanto maior o valor na escala, mais confiável é a identificação. Considerou-se como uma identificação aceitável aquelas que apresentaram valores ≥ 2.000 , indicando, de acordo com o FlexControl software 3.3, como uma identificação segura de gênero e provável de espécie (RODRIGUES et al., 2017).

Quadro 1. Informações extraídas do programa Bruker Daltonik MALDI descrevendo o significado dos valores em relação ao score obtido na amostra analisada.

Score	Identificação	Símbolo	Cor
2.300 – 3.000	Identificação altamente provável das espécies	(+++)	Verde
2.000 – 2.299	Identificação segura do gênero e provável das espécies	(++)	Verde
1.700 – 1.999	Identificação provável do gênero	(+)	Amarelo
0.000 – 1.699	Identificação não confiável	(-)	Vermelho

3.3 Detecção fenotípica de resistência de *Escherichia coli* aos betalactâmicos

3.3.1 Teste de Triagem

A técnica de difusão em disco foi executada de acordo com as recomendações dos comitês CLSI (2020) (Clinical na Laboratory Standards Institute) e BrCAST (2020) (Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Os discos de betalactâmicos foram depositados de forma estratégica para leitura interpretativa que objetivou indicar a suspeita e confirmação da produção de betalactamases na mesma placa, conforme ilustrado na figura 5. Porém, nesta sessão será abordada apenas a execução do teste de triagem.

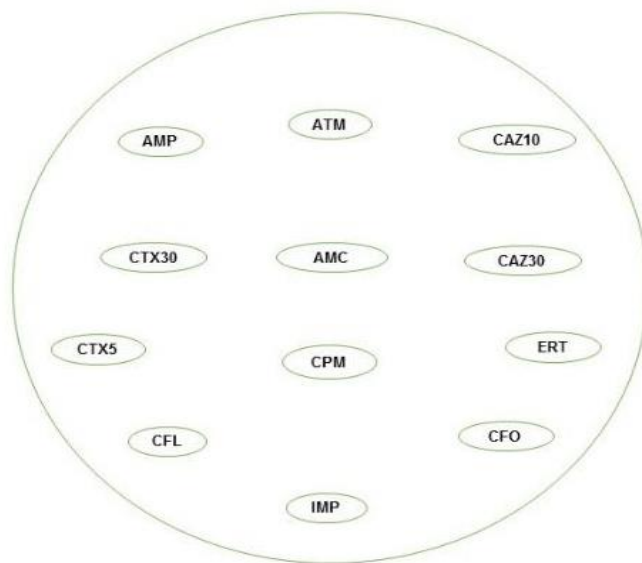


Figura 5: Localização dos discos de antimicrobianos na placa de ágar Müller Hinton para leitura interpretativa.

Legenda: AMC – amoxicilina com ácido clavulânico, CAZ30 – ceftazidima 30µg, CAZ10 – ceftazidima 10µg, CFO – cefoxitina, CTX30 – cefotaxima 30µg, CTX5 – cefotaxima 5µg, ATM – aztreonam 30µg, CPM – cefepime 30µg, IMP – imipenem 10µg, ERT – ertapenem 10µg, CFL – cefalotina 30µg, AMP – ampicilina 10µg.

Para tal, as cepas foram semeadas em ágar BHI e incubadas em estufa à 35°C +/- 2 °C por 24h. Após 24 h, com auxílio de uma alça bacteriológica, foram selecionadas e inoculadas de 4 a 6 colônias para uma solução salina, ajustada com o padrão de turvação 0,5 da escala de Mac Farland, que corresponde $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) / mL. Em seguida, com auxílio de um *swab*, o mesmo foi introduzido na solução salina, previamente padronizada, e foi realizada a semeadura no meio de ágar Muller-Hinton (Kasvi), em quatro direções, sendo colocados os discos de antimicrobianos (SensidiscDME) na placa de petri 140x15 mm, incubada em estufa à 35°C +/- 2 °C por 18h.

A avaliação da resistência aos betalactâmicos foi obtida, com auxílio de régua milimetrada, através da aferição do diâmetro dos halos de inibição de crescimento dos discos testados, sendo possível verificar a sensibilidade, a resistência intermediária ou a resistência aos mesmos, considerando ambos os documentos CLSI e BrCAST, conforme descritos nos quadros 2 e 3, respectivamente, para uma análise comparativa dos pontos de corte.

Quadro 2. Antimicrobianos utilizados e seus respectivos pontos de corte, segundo o CLSI (2017; 2020).

Antimicrobianos	Halo de Inibição (mm)*		
	S	I	R
Amoxicilina + Ac. Clavulânico (20/10 µg)	≥18	14-17	≤ 13
Ampicilina (10 µg)	≥17	14-16	≤ 13
Aztreonam (30 µg)	≥21	18-20	≤ 17
Cefalotina (30 µg)	≥18	15-17	≤ 14
Cefepime (30 µg)	≥25	**19-24	≤ 18
Cefotaxima (30 µg)	≥26	23-25	≤ 22
Cefoxitina (30 µg)	≥18	15-17	≤ 14
Ceftazidima (30 µg)	≥21	18-20	≤ 17
Ertapenem (10 µg)	≥22	19-21	≤ 18
Imipenem (10 µg)	≥23	20-22	≤ 19

Legenda: R: Resistente, I: Intermediário, S: Sensível, **SSD: Sensível com exposição aumentada.

Quadro 3. Antimicrobianos utilizados e seus respectivos pontos de corte, segundo BrCAST (2020).

Antimicrobianos	Halo de Inibição (mm)*		
	S	I	R
Amoxicilina + Ac. Clavulânico (20/10 µg)	≥ 16	-	<16
Ampicilina (10 µg)	≥14	-	<14
Aztreonam (30 µg)	≥26	21-25	<21
Cefalotina (-)	-	-	-
Cefepime (30 µg)	≥27	24-26	<24
Cefotaxima (5 µg)	≥20	17-19	<17
Cefoxitina (30 µg)	≥19	-	<19
Ceftazidima (10 µ)	≥22	19-21	<19
Ertapenem (10 µg)	≥25	-	<25
Imipenem (10 µg)	≥22	17-21	<17

Legenda: R: Resistente, I: Sensível com exposição aumentada., S: Sensível.

3.3.2 Confirmação da produção de ESBL por *E. coli*

A confirmação da produção foi realizada através da leitura dos testes de disco combinado e sinergismo em disco duplo, conforme ilustrado na figura 6 (CLSI, 2020 e BRCAST, 2020).

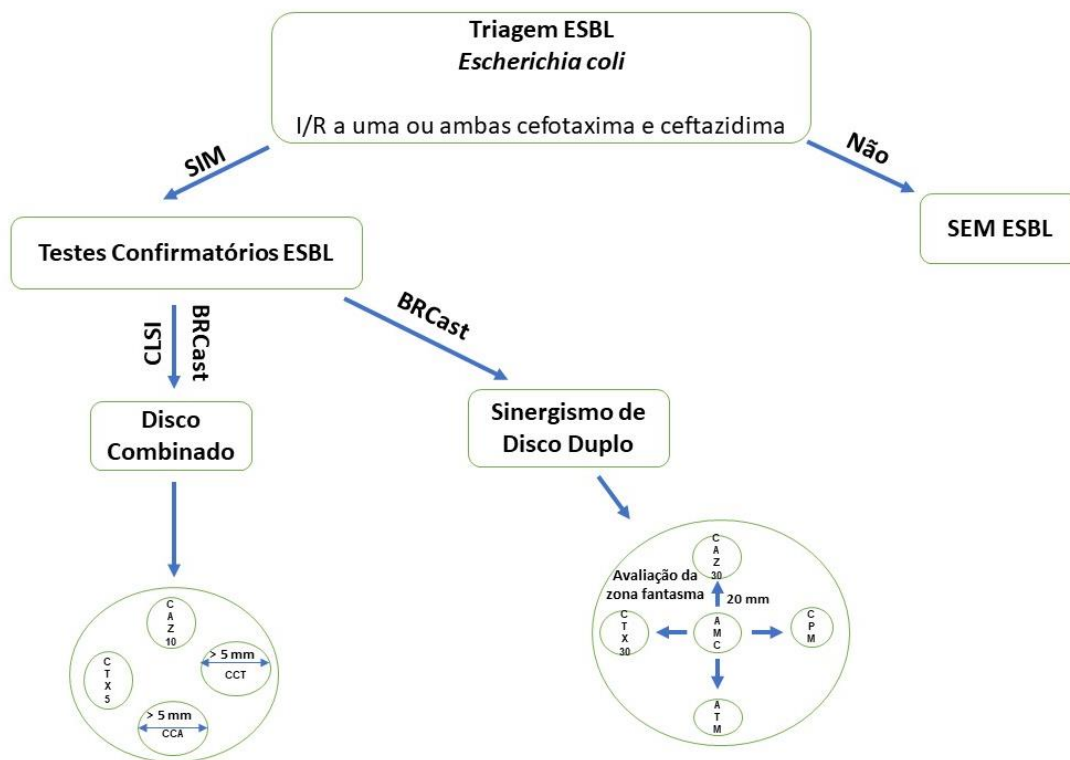


Figura 6. Esquema de triagem e confirmação de ESBL, de acordo com os métodos preconizados pelos documentos CLSI (2020) e BrCAST (2020). Legenda: **Disco Combinado:** Localização dos discos de antimicrobianos na placa de ágar Müller Hinton para leitura interpretativa. CAZ – ceftazidima 30 µg, CTX – cefotaxima 30 µg, CCA – ceftazidima com ácido clavulânico 30/10 µg, CCT – cefotaxima com ácido clavulânico 30/10 µg. **Sinergismo de Disco Duplo:** Localização dos discos de antimicrobianos, com distância de 20 mm, na placa de ágar Müller Hinton para leitura interpretativa. AMC – amoxicilina com ácido clavulânico 20/10 µg, CAZ30 – ceftazidima 30 µg, CTX30 – cefotaxima 30 µg, ATM – aztreonam 30 µg, CPM – cefepime 30 µg.

3.2.2.1 Teste do Disco Combinado – CLSI e BrCAST

Para cada teste, os discos contendo a cefalosporina de 30 µg isoladamente e em combinação com o ácido clavulânico 10 µg, foram aplicados. O halo de inibição em torno do disco de cefalosporina combinado com o ácido clavulânico é comparado com o halo em torno do disco com a cefalosporina isoladamente. O teste é positivo se o diâmetro do halo de inibição com o disco combinado for pelo menos 5 mm maior do que aquele com o disco sem o ácido clavulânico, conforme ilustrado na figura 5 CLSI M100 (2020), CLSI VET (2018) e BrCAST, (2020).

3.3.2.2 Teste de Sinergismo do Duplo Disco – BrCAST

As cepas de *E. coli* foram testadas através do sinergismo entre os discos de cefalosporina de terceira e quarta geração, no qual foram dispostos a 20 mm de distância de um disco contendo o inibidor de betalactamase. Tais discos foram posicionados na placa, sendo que no centro foi depositado um disco de amoxicilina+ácido clavulânico 20/10 µg, e ao redor deste foram colocados discos das cefalosporinas de terceira geração, cefotaxima 30 µg e ceftazidima 30 µg, e a cefalosporina de quarta geração, cefepime 30 µg, junto ao monobactâmico aztreonam 30 µg, a uma distância de 20 mm, centro a centro, conforme exposto na figura 3. Posteriormente, foram incubadas a 35°C +/- 2 °C por um período de 18 horas. Após a incubação, foi realizada a leitura, sendo considerado resultado positivo para produção de ESBL, quando houve a formação de “zona fantasma”, ou seja, as zonas de inibição em torno de qualquer um dos discos de cefalosporinas ficaram aumentadas na direção do disco que contém o ácido clavulânico, havendo uma deformação no halo de inibição (BrCAST, 2020).

3.3.2.3 Controle de qualidade do teste

Foram utilizadas como controle para cada teste realizado neste trabalho as seguintes cepas padrão: *Escherichia coli* ATCC25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 (CLSI, 2020) (BrCAST, 2020).

3.3.3 Detecção de AmpC

Na mesma placa, foram testadas as cefalosporinas de terceira geração, ceftazidima ou cefotaxima, junto a cefamicina, cefoxitina, no qual foram avaliadas as cepas que apresentaram resistência através de leitura interpretativa. A avaliação da resistência foi obtida, com auxílio de régua milimetrada, através da aferição do diâmetro dos halos de inibição de crescimento dos discos testados. As cepas que apresentaram halos < 19 para ceftazidima ou < 17 para cefotaxima, e apresentaram halo < 19 para cefoxitina, foram consideradas possíveis produtoras de AmpC (BrCAST, 2020).

3.3.3.1 Controle de qualidade do teste

Foi utilizado como controle para cada teste realizado neste trabalho a seguinte cepa padrão: *Escherichia coli* ATCC25922 (BrCAST, 2020).

3.3.4 Detecção de Carbapenemase

Nesta mesma placa, foram testados os carbapenêmicos, ertapenem e imipenem, no qual as cepas que apresentaram resistência através de leitura interpretativa, foram suspeitas de produzirem carbapenemase. A avaliação da resistência foi obtida, com auxílio de régua milimetrada, através da aferição do diâmetro dos halos de inibição de crescimento dos discos testados. As cepas que apresentassem halos ≤ 18 para ertapenem e ≤ 19 para imipenem, no CLSI, e halos < 25 para ertapenem e < 17 para imipenem no BrCAST, foram consideradas suspeitas de produzirem carbapenemase (CLSI M100 (2020), CLSI VET (2018) e BrCAST, 2020).

3.3.4.1 Controle de qualidade do teste

Foi utilizado como controle para cada teste realizado neste trabalho a seguinte cepa padrão: *Escherichia coli* ATCC25922 (CLSI, 2020) (BrCAST, 2020).

3.4 Análise Estatística

O brilho metálico verde em EMB foi avaliado pelos testes Qui-Quadrado (χ^2) e Teste de Fisher com intervalo de confiança de 95%, considerando o MALDI-TOF como padrão ouro na identificação da espécie. Os valores de suscetibilidade aos antimicrobianos foram expressos em porcentagens e as análises estatísticas dos valores obtidos nos ensaios de antibiograma foram analisados com o teste-T não pareado no software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação das *Escherichia coli*

Foram obtidas 273 amostras de urina de origem humana, nas quais foram semeadas em ágar EMB, para observação do brilho verde metálico. E, com auxílio da alça bacteriológica calibrada 10 µl, no qual a alça foi introduzida em uma amostra de urina bem homogeneizada, fazendo-se movimentos para baixo e para cima no sentido vertical. A alça carregada foi então utilizada para inocular cada meio de cultura, fazendo-se, inicialmente, uma linha reta no centro da placa e completando-se o espalhamento com uma série de passagens em um ângulo de 90°, através da linha original (Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde). A partir das 273 amostras, obtivemos 157 isolados bacterianos, sendo identificadas 132 cepas como *Escherichia coli*, através da técnica proteômica de MALDI-TOF MS para caracterização fenotípica das espécies. No presente estudo, foram selecionadas e analisadas 100 cepas de *E. coli*, das 132 identificadas.

Os 103 isolados animais (72 cães e 31 gatos), foram semeados em ágar EMB, para observação da produção do brilho verde metálico, sendo submetidos à técnica MALDI-TOF MS para caracterização fenotípica das espécies, identificando 97 cepas de *E. coli*.

Foi possível detectar que (147/197) produziu o brilho verde metálico, sendo 63% de amostras humanas (63/100) e 86,59% de amostras animais (84/97) (Figura 7). Conforme relatado por Antony e colaboradores (2016) *apud* Parisi & Marsik, (1969), os autores alertam que, em alguns casos, cepas de *E. coli* podem apresentar-se com coloração rosa no meio EMB, podendo prejudicar o curso da correta identificação laboratorial.

A sensibilidade do brilho metálico verde em EMB foi avaliada, considerando o MALDI-TOF como técnica padrão-ouro de identificação da espécie. Anteriormente, em nosso laboratório, um total de 183 enterobactérias foram testadas, e o sequenciamento de *gyrB* confirmou os resultados da técnica proteômica em 100% (RODRIGUES et al., 2017).

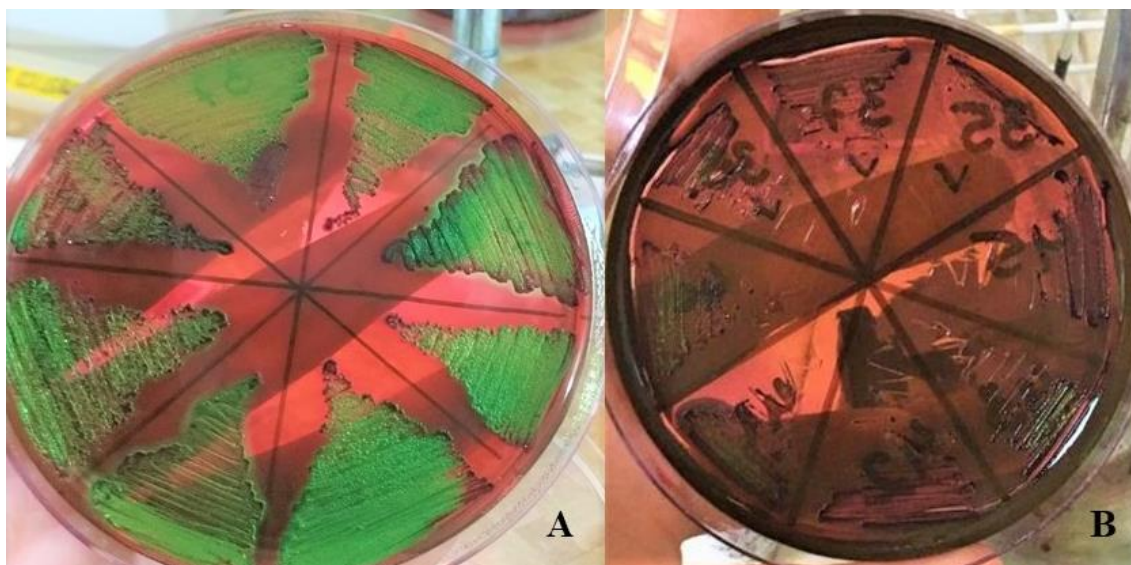


Figura 7. Avaliação do brilho verde em cepas de *Escherichia coli* oriundas de amostras animais semeadas em ágar EMB. Legenda: A – Crescimento de *Escherichia coli* com brilho verde metálico em meio EMB; B – Crescimento de *Escherichia coli* sem brilho verde metálico em meio EMB. **Fonte:** acervo próprio

Uma possível justificativa para ausência de produção do brilho em isolados de origem humana poderia ser pelo fato das amostras de urina terem sido semeadas diretamente no ágar EMB, diferentemente das cepas animais que foram re-isoladas após estoque em caldos microbiológicos. Os caldos microbiológicos apresentam pH neutro e o pH da urina com indicação de infecção urinária é comumente aferido acima de 7,5 e isto poderia influenciar na produção do brilho (Wattengel et al., 2019). Segundo Leininger e colaboradores (2001), em seu trabalho utilizando inoculação direta de leite em ágar EMB, a *E. coli* não produziu brilho metálico verde como esperado, indicando que essa coloração poderia ser sensível às mudanças no pH, onde a ausência de brilho poderia ser devido à alcalinidade do leite mastútico. Por outro lado, ao se utilizar cidra de maçã, cujo pH é ácido, os autores detectaram aumento na produção de brilho por parte das colônias presentes no meio, o que levou a resultados falso-positivos comparada ao isolamento de colônias semeadas diretamente no ágar EMB. Portanto, a metodologia de isolamento e o pH da amostra podem ser fatores cruciais para uma identificação mais precisa de *Escherichia coli*. O que é preocupante uma vez que muitos laboratórios de rotina semeiam urina diretamente em meio EMB para avaliação do aspecto colonial.

4.2 Resistência de *E.coli* proveniente de amostras humanas e animais, aos betalactâmicos, considerando os pontos de corte do CLSI (2020) e BrCAST (2020).

Através da leitura interpretativa dos antibiogramas, foi possível detectar perfis fenotípicos heterogêneos de ambas as amostras, considerando os pontos de corte do CLSI (2020) e BrCAST (2020), conforme demonstrados nas tabelas 1,2,3,4.

Tabela 1. Antibiotipagem de *E. coli*, provenientes de amostras humanas, considerando o CLSI (2020).

Perfil	Isolados	A M C	A M P	A T M	C A Z	C F L	C F O	C P M	C T X	E R T	I M P
1	6,10,15,17,19,20,40,44,45,47,49,51,57,61,66,69,99,102,104,118,120,123,128,132,140,141,143,144,154,155,162,164,166,170,174,177,178,180,184,191,192,198,200A,200B,202A,202B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	7,8,9,14,27A,27B,29,30,58,62,70,125,138,145,146,149,152,159,163,168,179,199,204,210,212,216,217	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
3	43,60,114,127,214	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
4	101,139,167,171,175	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S
5	5,183	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
6	12A,135	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S
7	52,53	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S
8	33A	S	S	S	S	S	S	S ^o	I	S	S
9	98	S	R	R	I	R	S	R	R	S	S
10	117	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S
11	122	S	R	R	R	R	I	R	R	R	S
12	156	R	R	S	S	R	S	S ^o	S	S	S
13	165	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S
14	11	S	R	S	S	I	R	S	S	S	S
15	12B	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	151	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
18	100	I	R	I	I	R	S	R	R	S	S
19	215	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S

Legenda: AMC – amoxicilina com ácido clavulânico, AMP – ampicilina, ATM – aztreonam, CAZ – ceftazidima, CFL – cefalotina, CFO – cefoxitina, CPM – cefepime, CTX – cefotaxima, ERT – ertapenem, IMP – imipenem.

R: Resistente, I: Intermediário, S: Sensível, S^o: Sensível com exposição aumentada

Tabela 2. Antibiotipagem de *E. coli*, provenientes de amostras humanas, considerando o BrCAST (2020).

Perfil	Isolados	A M C	A M P	A T M	C A Z	C F L	C F O	C P M	C T X	E R T	I M P
1	6,10,15,17,19,20,40,43,44,45,47,49,51,57,60,61,66,69,99, 102,104,114,118,120,123,127,128,132,140,141,143,144,154,155, 162,164,166,170,174,177,180,184,191,192,198,200A,200 B,202A,202B,214	S	S	S	S	N	S	S	S	S	S
2	5,7,8,9,14,27A,27B,29,30,62,70,101,125,138,139,145,146,149, 159,167,171,175,179,183,199,210,212,216,217	S	R	S	S	N	S	S	S	S	S
3	152,163,168,204	S	R	S	I	N	S	S	S	S	S
4	98,100,117	S	R	R	R	N	S	R	R	S	S
5	52,53	R	R	I	I	N	S	R	R	S	S
7	12B,215	R	S	S	S	N	S	S	S	S	S
6	12A	R	R	S	S	N	R	S	S	S	S
8	11	S	R	S	S	N	R	S	S	S	S
9	33A	S	S	S	S	N	S	R	S	S	S
10	58	S	R	S	S	N	S	S	S	S	S
11	122	S	R	R	R	N	R	R	R	R	S
12	151	R	R	S	S	N	S	S	S	S	S
13	135	R	R	S	I	N	R	S	S	S	S
14	156	R	R	S	I	N	S	R	S	S	S
15	178	S	S	I	S	N	S	S	S	R	S
16	165	S	R	S	R	N	S	S	R	S	S

Legenda: AMC – amoxicilina com ácido clavulânico, AMP – ampicilina, ATM – aztreonam, CAZ – ceftazidima, CFL – cefalotina, CFO – ceftoxitina, CPM – cefepime, CTX – cefotaxima, ERT – ertapenem, IMP – imipenem.

R: Resistente, I: Sensível com exposição aumentada, S: Sensível, N: não se aplica.

Tabela 3. Antibiotipagem de *E. coli*, provenientes de amostras animais, considerando o CLSI (2020).

Perfil	Isolados	A M C	A P	A M	T	C A Z	C F L	C F O	C P M	C T X	E R T	I M P
1	2,7,12,17,25,26,28,31,32,37,41,47,55,56,60,63,65,66,73,74,88,92,95,96,98,99,100,104,105	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	6,10,11,14,49,61,67,70,71,75,80,83,87,103	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	8,13,15,16,43,46,51,53,68,77,79	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S
4	1,9,18,20,22,45,48,82	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
5	19,38,42,72,86,90	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
6	23,24,33,69,78	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
7	19,38,42,72,86,90	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
8	3,30,76	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
9	35,39	I	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
10	59,85	I	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
11	81,89	S	R	S	I	R	S	S ^o	R	S	S	S
12	34	R	R	R	I	R	S	R	R	S	S	S
13	50	R	R	I	R	R	R	S	R	S	S	S
14	4	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S
15	27	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
16	29	S	R	R	R	R	S	S ^o	R	S	S	S
17	40	S	R	S	S	R	S	S ^o	R	S	S	S
18	54	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
19	62	I	R	I	I	R	S	S ^o	R	S	S	S
20	64	R	R	S	I	R	R	S	I	S	S	S
21	84	S	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S
22	91	R	R	R	R	R	R	S ^o	R	S	S	S
23	93	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
24	97	S	R	R	I	R	S	S ^o	R	S	S	S
25	101	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
26	106	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S

Legenda: AMC – amoxicilina com ácido clavulânico, AMP – ampicilina, ATM – aztreonam, CAZ – ceftazidima, CFL – cefalotina, CFO – ceftoxitina, CPM – cefepime, CTX – cefotaxima, ERT – ertapenem, IMP – imipenem.

R: Resistente, I: Intermediário, S: Sensível. S^o: Sensível com exposição aumentada

Tabela 4. Antibiotipagem de *E. coli*, provenientes de amostras animais, considerando o BrCAST (2020).

Perfil	Isolados	A M C	A M P	A T M	C A Z	C F L	C F O	C P M	C T X	E R T	I M P
1	1,2,7,9,12,17,18,25,22,26,28,31,32,37,41,45,47,48, 55,56,60,63,65,66,73,82,92,96,98,100,104,105	S	S	S	S	N	S	S	S	S	S
2	6,8,11,13,14,15,19,35,38,42,46,49,51,53,61,67,68,70,71,72,77, 79,80,83,90,103	S	R	S	S	N	S	S	S	S	S
3	24,29,62,69,78,85,97	S	R	R	R	N	S	R	R	S	S
4	74,88,93,95,99	S	S	S	I	N	S	S	S	S	S
5	3,30,59,76	R	R	R	R	N	S	R	R	S	S
6	16,75,86,87	S	R	S	I	N	S	S	S	S	S
7	91,101	R	R	R	R	N	R	I	R	S	S
8	23,33	S	R	R	S	N	S	R	R	S	S
9	4	R	R	S	S	N	S	S	S	S	S
10	20	S	S	S	R	N	S	S	S	S	S
11	54	S	S	S	I	N	R	S	S	S	S
12	40	S	R	S	I	N	S	R	R	S	S
13	34	R	R	R	S	N	S	R	R	S	S
14	10	S	R	I	S	N	S	S	S	S	S
15	81	S	R	I	R	N	S	R	R	S	S
16	89	S	R	I	R	N	S	I	R	S	S
17	84	S	R	I	I	N	S	R	R	S	S
18	27	R	S	I	I	N	S	S	S	S	S
20	50	R	R	R	R	N	R	S	R	S	S
21	39	R	R	S	R	N	S	S	S	S	S
22	64	R	R	I	R	N	R	S	I	S	S
23	43	S	R	S	S	N	S	I	S	S	S
24	106	R	R	R	R	N	R	R	R	S	S

Legenda: AMC – amoxicilina com ácido clavulânico, AMP – ampicilina, ATM – aztreonam, CAZ – ceftazidima, CFL – cefalotina, CFO – cefoxitina, CPM – cefepime, CTX – cefotaxima, ERT – ertapenem, IMP – imipenem.

R: Resistente, I: Sensível com exposição aumentada, S: Sensível, N: não se aplica.

Os resultados da suscetibilidade antimicrobiana considerando os diferentes pontos de corte e diferentes origens, estão explicitados na tabela 5.

4.2.1 Origem humana

Quanto ao percentual de resistência antimicrobiana, considerando os pontos de corte do CLSI (2020), foi verificado: 8% à amoxicilina/ ácido clavulânico; 46% à ampicilina; 4% à aztreonam; 12% à cefalotina; 6% à cefepime; 7% à cefotaxima; 3% à ceftazidima; 2% à ceftazidima; 1% à ertapenem; 0% à meropenem. Considerando os pontos de corte do BrCAST, foi detectado: 8% à amoxicilina/ ácido clavulânico; 46% à ampicilina; 4% à aztreonam; 8% à cefepime; 7% à cefotaxima; 4% à ceftazidima; 5% à ceftazidima; 2% à ertapenem; 0% à imipenem.

4.2.2 Origem animal

Quanto ao percentual de resistência antimicrobiana, considerando os pontos de corte do CLSI, foi verificado: 10,30% à amoxicilina/ ácido clavulânico (5,15% cães / 5,15% gatos); 58,76% à ampicilina (41,24% cães / 17,52 % gatos); 16,49% à aztreonam (10,60% cães / 5,88% gatos); 34,02% à cefalotina (22,68% cães / 11,34% gatos); 13,40% à cefepime (8,24% cães / 5,15% gatos); 22,68% à cefotaxima (14,04% cães / 8,64% gatos); 5,15% à ceftazidima (3,09% cães / 2,06% gatos); 15,46% à ceftazidima (7,73% cães / 7,73% gatos); 0% à ertapenem; 0% à imipenem. Enquanto no BrCAST, foi verificado: 13,40% à amoxicilina/ ácido clavulânico (8,29% cães / 5,10% gatos); 58,76% à ampicilina (40,52% cães / 18,23% gatos); 18,55% à aztreonam (7,73% cães / 7,73% gatos); 18,55% à cefepime (7,73% cães / 7,73% gatos); 22,68% à cefotaxima (13,40% cães / 9,27% gatos); 6,18% à ceftazidima (4,12% cães / 2,06% gatos); 20,61% à ceftazidima (12,17% cães / 8,43% gatos); 0% à ertapenem; 0% à imipenem.

Tabela 5. Suscetibilidade antimicrobiana de *E. coli* proveniente de humanos, considerando os pontos de corte do CLSI (2020) e BrCAST (2020).

Antimicrobianos	Pontos de corte		Amostras Humanas		Amostras Animais	
	BrCAST	CLSI	BrCAST	CLSI	BrCAST	CLSI
Amoxicilina + Ac. clav. (20/10 µg)	R: <16	R: ≤13	8%	8%	13,40%	10,30%
	I: -	I: 14-17	-	1%	-	8,24%
	S: ≥16	S: ≥18	92%	91%	86,59%	81,44%
Ampicilina (10 µg)	R:<14	R: ≤ 13	46%	46%	58,76%	58,76%
	I: -	I: 14-16	-	0%	-	0%
	S: ≥ 14	S: ≥ 17	54%	54%	41,23%	41,23%
Aztreonam (30 µg)	R:<21	R: ≤ 17	4%	4%	18,55%	16,49%
	I ^c : 21-25	I: 18-20	3%	0%	6,18%	2,06%
	S: ≥26	S: ≥21	93%	96%	75,25%	81,44%
Cefalotina (- , 30 µg)	R: -	R: ≤ 14	-	12%	-	34,02%
	I: -	I: 15-17	-	12%	-	20,61%
	S: -	S: ≥ 18	-	76%	-	45,36%
Cefepime (30 µg)	R:< 24	R: ≤ 18	8%	6%	18,55%	13,40%
	I ^c : 24-26	SSD ^c : 19-24	0%	2%	4,12%	7,21%
	S: ≥ 27	S: ≥ 25	92%	92%	77,31%	79,38%
Cefotaxima (5 µg, 30 µg)	R:<17	R: ≤ 22	7%	7%	22,68%	22,68%
	I ^c : 17-19	I: 23-25	0%	1%	1,03%	1,03%
	S: ≥20	S: ≥ 26	93%	92%	76,28%	76,28%
Cefoxitina (30 µg)	R:< 19	R: ≤14	4%	3%	6,18%	5,15%
	I: -	I:15-17	-	1%	-	0%
	S: ≥ 19	S: ≥18	96%	96%	93,81%	94,84%
Ceftazidima (10µg, 30 µg)	R:< 19	R: ≤ 17	5%	2%	20,61%	15,46%
	I ^c : 19-21	I:18-20	8%	2%	13,40%	6,18%
	S: ≥ 22	S: ≥21	87%	96%	65,97%	78,35%
Ertapenem (10 µg)	R:<25	R: ≤18	2%	1%	0%	0%
	I:-	I:19-21	-	0%	0%	0%
	S: ≥ 25	S: ≥22	98%	99%	100%	100%
Imipenem (10 µg)	R:<17	R: ≤19	0%	0%	0%	0%
	I ^c : 17-21	I:20-22	0%	0%	0%	0%
	S: ≥22	S: ≥23	100%	100%	100%	100%

Legenda: R: Resistente, I: Intermediário, I^c: sensível com exposição aumentada S: Sensível, SSD: sensível com exposição aumentada.

As figuras 8 e 9 ilustram os perfis de suscetibilidade das amostras humanas e animais, respectivamente, comparando os documentos CLSI (2020) e BrCAST (2020).

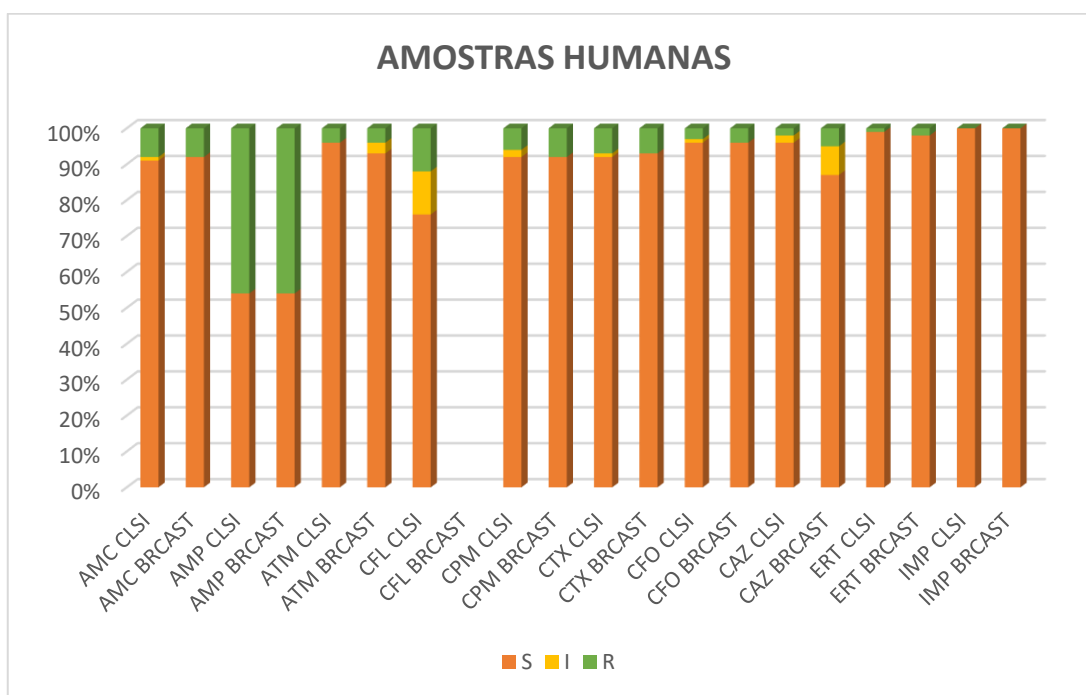


Figura 8: Perfil de suscetibilidade de *E. coli* proveniente de humanos, considerando os pontos de corte do CLSI (2020) e BrCast (2020).

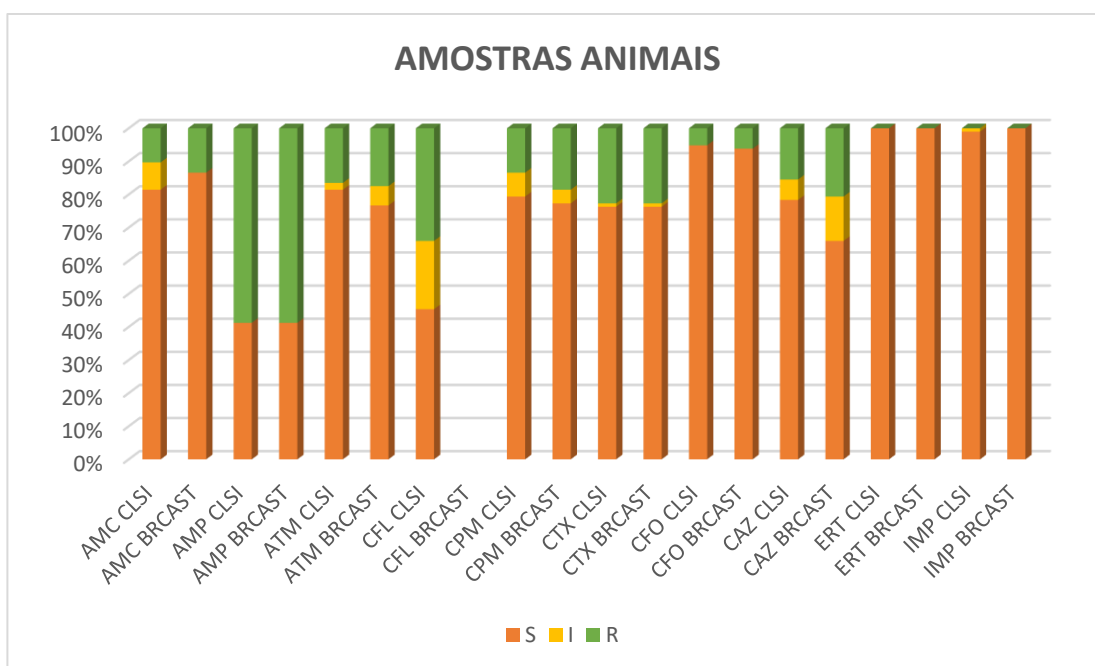


Figura 9: Perfil de suscetibilidade de *E. coli* proveniente de animais, considerando os pontos de corte do CLSI (2020) e BrCast (2020).

Os resultados apresentaram percentual de resistência inferior a 50% nos antimicrobianos testados, em ambos os grupos de amostras e em ambos os documentos. Considerando ambas as amostras, a ampicilina foi a menos eficaz, provavelmente pelo fato das aminopenicilinas serem os betalactâmicos mais prescritos tanto na medicina humana quanto veterinária, em especial para tratamentos de infecções urinárias.

Os genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* tem sido frequentemente detectados em *E.coli* resistentes à ampicilina e a próxima etapa do presente estudo será a detecção de ambos os genes, com o intuito de comprovar tal relação (CHANG et al., 2015).

Considerando a origem das amostras, foi observado maior resistência em *E. coli* de origem animal do que em humanos. Um dos fatores pode ser a falta de controle de vendas de antimicrobianos na medicina veterinária, enquanto na medicina humana o controle de medicamentos à base de antimicrobianos está em vigor desde 2010, conforme a RDC 44/2010. Em todo o mundo, há marcada diferença em relação a regulação, disponibilidade de mercado, distribuição e utilização de produtos antimicrobianos em medicina veterinária. Em muitos países, fármacos licenciados para uso humano são administrados para animais e produtos veterinários são utilizados em espécies animais para as quais a bula não indica como apropriados (“off-label use”). Porém os dados sobre o uso indiscriminado de antimicrobianos em animais são sempre mais focados em animais de produção, considerando os aditivos zootécnicos e metafilaxia, sendo que o real diagnóstico da má utilização de antimicrobianos em pets é, de fato, difícil de constatar. (GUARDABASSI et al., 2010)

O tratamento adequado da infecção do trato urinário, deve ser direcionado de acordo com a gravidade da enfermidade no hospedeiro. Dessa forma, sendo indicado a avaliação primária da real necessidade de terapia antimicrobiana, visto que a infecção poderia ser debelada em decorrência da resposta imunológica do próprio hospedeiro. Mas, na maioria dos casos a antibioticoterapia é iniciada logo no primeiro sinal de desconforto. (KOGIKA & WAKI, 2015).

Na medicina veterinária, em pequenos animais, recomenda-se, inicialmente, amoxicilina por 2 semanas, não sendo conduta obrigatória realizar a urocultura antes do término da terapia. No entanto, em relação ao período de terapia, atualmente há indagações e sugestões para a administração de altas doses do antimicrobiano em curto período, visto que podem acarretar irritação gástrica, gerando desconforto para o animal (OLIN & BARTHES, 2015).

Na medicina humana, a indicação de antimicrobianos administrados por período curto, tornou-se o tratamento padrão da cistite bacteriana aguda não complicada e os benefícios desse tipo de terapia incluem a melhor adesão pelo paciente, menor custo e diminuição dos efeitos adversos, principalmente os efeitos colaterais decorrentes do uso prolongado, pois o objetivo do tratamento é diminuir a carga bacteriana o suficiente para controlar as manifestações clínicas e, na sequência, aguardar o sistema imunológico do paciente eliminar os organismos remanescentes. A indicação de antimicrobiano de amplo espectro e com alta excreção urinária poderá ser recomendada em situações de ITU simples, desde que a infecção esteja associada a manifestações clínicas evidentes em que não houve a administração prévia de nenhum antimicrobiano, e antes de se obter os resultados da urocultura e antibiograma. Assim, antimicrobianos de primeira escolha incluem a amoxicilina, o trimetoprim + sulfametoxazol ou a cefalexina (OLIN & BARTHES, 2015).

Considerando o percentual de resistência a partir dos pontos de corte dos dois documentos normativos, foi possível avaliar que em relação à ceftazidima e cefepime em ambas as amostras clínicas e, aztreonam e amoxicilina+ácido clavulânico, apenas nas amostras animais, houve discrepância entre os valores de resistência detectados (figuras 10 e 11).

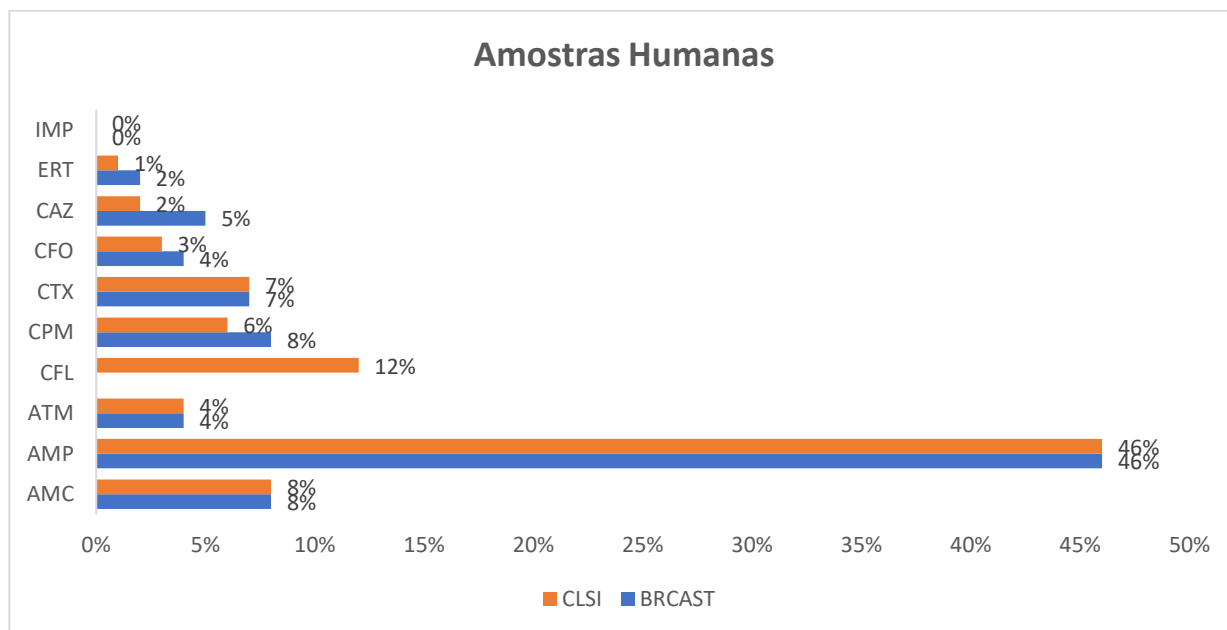


Figura 10: Percentual de resistência das amostras humanas, considerando os pontos de corte do CLSI (2020) e BrCast (2020).

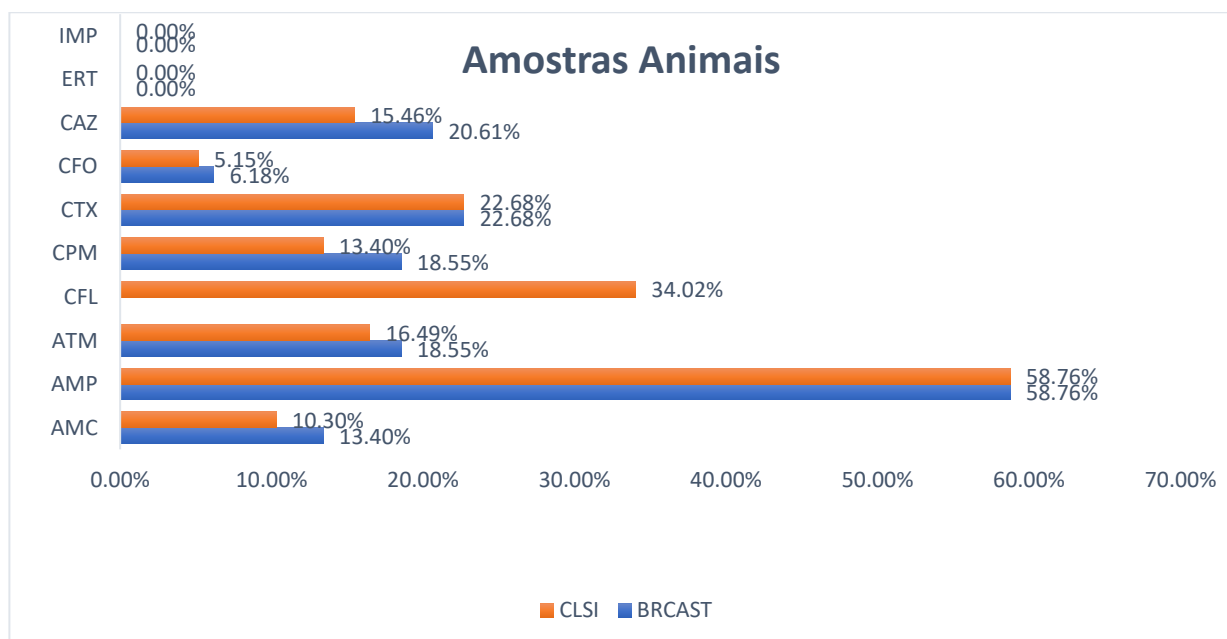


Figura 11: Percentual de resistência das amostras animais, considerando os pontos de corte do CLSI (2020) e BrCAST (2020).

Porém, após análise estatística, realizada através do teste T não pareado, pelo programa GraphPad Prism 6, o mesmo demonstrou que não houve diferença significativa entre os valores encontrados, ou seja, todos os valores obtidos nos antibiogramas, se mostraram estatisticamente iguais dentro de um intervalo de confiança de 95% (ANEXO A,B,C,D). Polsfuss et al. em 2011 também compararam os pontos de corte do EUCAST e CLSI na triagem para β -lactamases de espectro estendido (ESBL) produzida por enterobactérias e não encontraram diferença significativa na sensibilidade das duas diretrizes na detecção de isolados produtores da enzima. Já um estudo mais recente de Hombach et al., 2013 demonstrou diferenças significativas nas taxas

de suscetibilidade para antimicrobianos, incluindo cefepime, ceftazidima e cefotaxima na detecção de ESBLs considerando as diretrizes CLSI 2013 e EUCAST 2013. Este estudo recomendou ajustes nos pontos de corte para harmonizar ainda mais as duas diretrizes. Desde então, as diretrizes de 2014 e 2015 para ambos os sistemas foram divulgadas em um esforço para harmonizar os pontos de ruptura clínicos (*apud* KASSIM et al., 2016).

4.3.1 Suspeita da produção de ESBL por *E. coli* provenientes de amostras humanas e animais, segundo CLSI e BrCAST.

A técnica de difusão em disco foi utilizada para análise da triagem da produção de ESBL, considerando a resistência à ceftazidima e cefotaxima em suas diferentes concentrações e pontos de corte estabelecidos pelo BrCAST (2020) e CLSI (2020).

Um total de 10% (10/100) e 11,16% (22/197) de *E. coli* provenientes de amostras humanas e animais, respectivamente, foram suspeitas de produzirem ESBL no teste de triagem. Dentre elas, 56,25% (18/32) apresentaram a suspeita considerando os pontos de corte dos dois documentos preconizados (Tabela 6). As demais, apresentaram divergência quando aplicados os diferentes pontos de corte. Ou seja, em caso de utilização do documento do CLSI, três isolados (9,37%) seriam desconsiderados como suspeitos. O mesmo aconteceria em cinco isolados (15,62%), caso fosse utilizado apenas o BrCAST (2020).

Tabela 6. Resultado da triagem de ESBL em cepas de *E. coli* isoladas humanas e animais, considerando os documentos CLSI (2020) e BrCAST (2020).

Isolados humanos	Isolados animais	CLSI	BrCAST
52, 53, 98, 100,177,122	3,24, 29,30,50,59,62,64,69, 76,79,81,85,89,91,97, 101,106	+	+
156,183	23,33,34	+	
165	40,84		+

Apesar da Portaria de nº 64 de dezembro de 2018, que padroniza a implementação do BrCAST, com intuito de facilitar o acesso aos documentos, muitos laboratórios ainda utilizam o CLSI, pela dificuldade em encontrar antimicrobianos com concentrações diferentes, e também pelo atraso da atualização de painéis de sistemas automatizados, podendo assim gerar resultados discrepantes. Sendo assim, mesmo com uma amostragem pequena, foi possível detectar que houve diferença na triagem dos isolados suspeitos de produzirem ESBL.

4.3.2 Confirmação da produção de ESBL por *E. coli* provenientes de amostras humanas e animais, segundo CLSI e BrCAST.

Do total de 32 isolados suspeitos, 81,25% (26/32) foram confirmados nos testes considerando pelo menos em um documento normativo (Tabela 7, figura 12).

Tabela 7. Resultado dos testes confirmatórios da produção de ESBL em cepas de *E.coli* isoladas humanos e animais, considerando os documentos CLSI (2020) e BrCAST (2020).

Isolados humanos (n=7)	Isolados animais (n=19)	Testes confirmatórios	
		Disco combinado* (n=26)	Sinergismo em disco duplo** (n=22)
52,53,98,100, ,117,122, 165	3,23,24,29,30,3 3,34,59,62,69, 76,78,81,85,89, 91,97,101 ,106	52,53,98,100,117,122,165, 3,23,24,29,30,33,34,59,62, 69,76,78,81,85,89,91,97, 101,106	52,53,98,100,117,3,23,24, 29,30,33,34,59,62,69,76,7 8,81,85,89,97,106

* Preconizado pelo CLSI e BrCAST; ** preconizado pelo BrCAST.

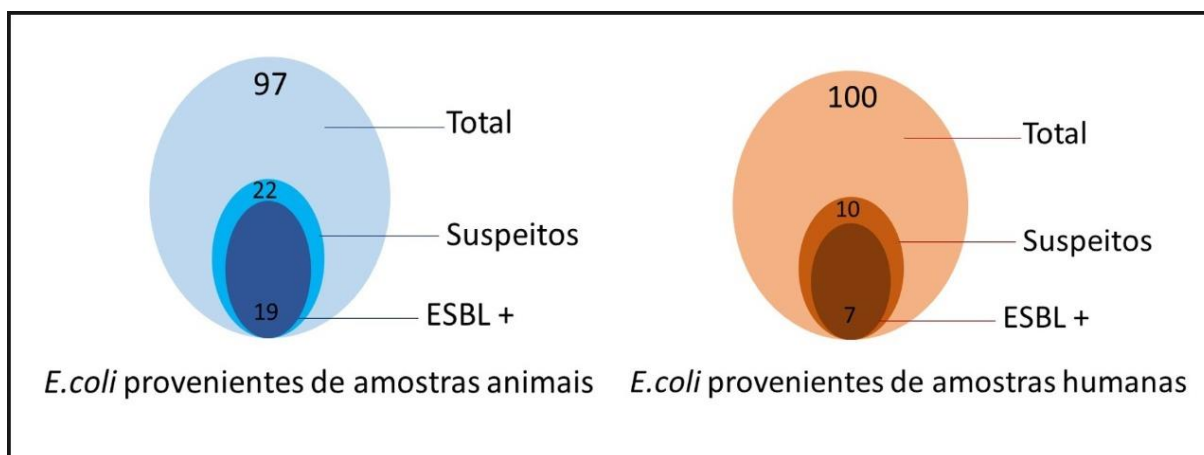
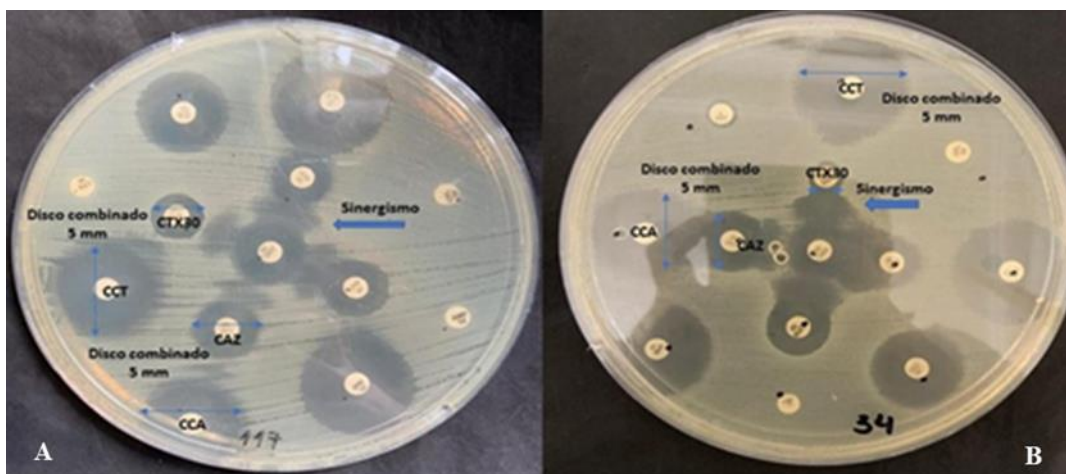


Figura 12. Diagrama de Venn apresentando o universo de *E. coli* suspeitas e positivas para ESBL, considerando as diferentes origens de amostras.

Nos isolados de *E.coli* provenientes de amostras humanas, dez (10%, 10/100) foram suspeitos de produzirem ESBL, sendo sete (70%, 7/100) confirmados através de métodos fenotípicos (Figura 13). Dentre estas, cinco (71,4%, 5/7) cepas foram positivas nos métodos de sinergismo de disco duplo e disco combinado e, duas (28,5%, 2/7) foram positivas somente para o teste de disco combinado.



Fonte: Acervo próprio.

Figura 13. Antibiograma realizado por difusão em disco, apresentando sinergismo em disco duplo e positividade no disco combinado, em amostra humana (A) e animal (B).

Na análise das cepas de *E. coli* provenientes de amostras animais, um total de 22 (22,68%, 22/97) apresentou suspeita na produção de ESBL, sendo 19 (86,6%, 19/22) confirmadas através de métodos fenotípicos, no qual 17 (89,4%, 17/19) foram positivas para os métodos de sinergismo de disco duplo e disco combinado e, duas (10,52%, 2/19) foram positivas somente para o teste de disco combinado.

Ou seja, considerando ambas as origens dos isolados, foi possível perceber que algumas cepas apresentavam a produção de ESBL no teste de disco combinado porém não demonstravam a “zona fantasma” no teste de sinergismo de disco duplo. Sendo assim, a técnica de disco combinado revelou uma possível produção da enzima em maior parte dos isolados suspeitos.

Apesar disso, em estudo de Lezameta et al (2010), os autores demonstraram que o método de sinergismo de disco duplo foi tão sensível e específico quanto o método de disco combinado, além de apresentar a vantagem de utilizar os mesmos materiais e procedimentos de um antibiograma de rotina. Os autores também concluem que, mesmo o método de disco combinado sendo operacionalmente mais simples -principalmente quando é necessário avaliar muitas amostras, a sua desvantagem está na dificuldade de padronização na localização e distância dos discos, que podem levar a resultados errôneos em pessoal inexperiente. De fato, é importante a execução de pelo menos duas técnicas para confirmação da produção de ESBL e a disposição dos discos na mesma placa do antibiograma, contendo discos de outras classes de antimicrobianos, pode ser uma ferramenta eficaz na busca por este mecanismo de resistência em enterobactérias.

4.3.3 Detecção de AmpC em *E. coli* provenientes de amostras humanas e animais

A técnica de difusão em disco foi utilizada para análise da possível produção de AmpC, considerando a resistência à ceftazidima ou cefotaxima, e a cefoxitina (BrCAST, 2020). Das 100 amostras humanas, apenas 1% (1/100) foi suspeita de produzir de AmpC, enquanto 5,15% (5/97) das amostras animais foram possivelmente produtoras da enzima, conforme descrito na tabela 8.

Tabela 8. Perfil de resistência dos isolados de *E. coli* de humano e animais suspeitos de produzirem AmpC, BrCAST (2020).

Isolados	Origem	A M C	A M P	A T M	C A Z	C F L	C F O	C P M	C T X	E R T	I M P
122	Humano	S	R	R	R	N	R	R	R	R	S
50	Animal	R	R	R	R	N	R	S	R	S	S
64	Animal	R	R	I	R	N	R	S	I	S	S
91,101	Animal	R	R	R	R	N	R	I	R	S	S
106	Animal	R	R	R	R	N	R	R	R	S	S

Legenda: AMC – amoxicilina com ácido clavulânico, AMP – ampicilina, ATM – aztreonam, CAZ – ceftazidima, CFL – cefalotina, CFO – cefoxitina, CPM – cefepime, CTX – cefotaxima, ERT – ertapenem, IMP – imipenem. R: Resistente, I: Sensível com exposição aumentada, S: Sensível, N: não se aplica.

Escherichia coli é um produtor natural de AmpC, e seu promotor e atenuador são fracos, por isso pode não produzir enzima em quantidade suficiente para demonstrar fenotipicamente esta característica. Esta espécie com resistência fenotípica à cefoxitina é considerada super produtora de AmpC devido à aquisição de um promotor de *Shigella* spp., mutação em promotor e/ou em atenuador, deleção do atenuador ou por aquisição de AmpC plasmidial, como CMY (JORGENSEN et al., 2010 *apud* SANTIAGO, 2017).

Desses seis isolados suspeitos de produzirem AmpC, 66,66% (4/6) expressaram co-produção de ESBL, sendo um isolado de origem humana e três de origem animal.

As betalactamases de espectro estendido (ESBLs) e AmpC betalactamases (AmpCs) surgiram globalmente em humanos e animais. São enzimas capazes de hidrolisar cefalosporina de espectro estendido, enquanto os AmpCs têm um espectro de resistência mais amplo às cefalosporinas, incluindo as cefamicinas (cefoxitina e cefotetan). As enzimas ESBL e AmpC estão localizados principalmente em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, que podem ser transferidos para outras bactérias em humanos, animais ou no ambiente. No entanto, o AmpC é menos frequentemente relatado do que a ESBL (SUKMAWINATA et al., 2020).

Em estudos, BORTOLAMI et al. (2019) relata a crescente prevalência de ESBL/AmpC em *Enterobacteriales* de origem animal e o aumento da taxa de isolamento por laboratórios veterinários. Muitos estudos têm investigado os riscos zoonóticos e a prevalência de transporte fecal ou caracterizaram a produção de isolados da ESBL/AmpC a partir de espécimes clínicos em animais (DIERIKX et al., 2012; HORDIJK et al., 2013; MAEYAMA et al., 2018; ZOGG et al., 2018).

4.3.4 Detecção de carbapenemase em *E. coli* provenientes de amostras humanas e animais

A técnica de difusão em disco foi utilizada para análise da produção de carbapenemase, considerando a resistência à imipenem e a ertapenem. O imipenem foi testado para avaliar sua sensibilidade na detecção de carbapenemase, enquanto o ertapenem é preconizado pelos dois documentos normativos. Tanto nos isolados provenientes de amostras humanas quanto de animais,

não foi detectada resistência ao imipenem, porém em isolados de amostras humanas foi possível detectar resistência ao ertapenem em 1% (1/100) considerando o ponto de corte do CLSI e 2% (2/100) considerando o ponto de corte do BrCAST.

Estudos mostram que os testes baseados em ertapenem são os mais sensíveis para detectar produção de carbapenemase, embora apresentem uma especificidade relativamente baixa (ANDERSON e BOERLIM, 2020).

Anderson & Boerlim (2020) descreveram a preocupação epidemiológica da produção de carbapenemase em *Enterobacterales*, pois os genes carbapenemase são frequentemente localizados em elementos genéticos móveis, como transposons, integrons e plasmídeos, e podem ser transferidos horizontalmente entre as células, enquanto os outros mecanismos de resistência ao carbapenem são menos propensos a essa transferência. A transferência ativa de plasmídeos de codificação de carbapenemase entre cepas, espécies e gêneros bacterianos tem sido documentada repetidamente, em ambientes hospitalares.

Smith et al. (2019) relatou que os carbapenêmicos são pouco utilizados na medicina veterinária, descrevendo o primeiro uso de meropenem em Medicina Veterinária, no Brasil no ano de 1999 como um tratamento para conjuntivite. Sua ação é semelhante ao do imipenem, mas o meropenem é mais eficaz contra a ordem *Enterobacterales* e menos ativo contra bactérias Gram-positivas. Embora não aprovados para uso veterinário, ambos são prescritos legalmente em algumas jurisdições para uso extraordinário, principalmente para o tratamento de infecções resistentes em cães e gatos, e especialmente isolados de *E. coli* multirresistentes. Atualmente, são poucos os dados sobre os padrões de prescrição e poucas orientações sobre o uso apropriado de carbapenêmicos na medicina veterinária de pequenos animais. (SMITH et al.,2019)

5 CONCLUSÕES

- No presente estudo foram analisadas 197 cepas de *E. coli* a partir de amostras de urina provenientes de humanos e animais;
- Todos isolados apresentaram perfil de resistência inferior a 50% frente aos antimicrobianos testados;
- A ampicilina apresentou ser o antimicrobiano com menor eficácia, considerando tanto os pontos de corte do CLSI (2020) quanto do BrCAST (2020);
- Foram suspeitas de produzirem ESBL no teste de triagem um total de 10% (10/100) e 11,16% (22/197) de *E. coli* provenientes de amostras humanas e animais, respectivamente;
- Não houve diferença significativa considerando os pontos de corte de ambos os documentos preconizados;
- Considerando os pontos de corte de ambos os documentos preconizados 56,25% (18/32) apresentaram a suspeita de produzirem ESBL;
- Foram confirmados 81,25% (26/32), do total de isolados suspeitos nos testes-considerando pelo menos um documento normativo;
- Apenas 1% (1/100) e 5,15% (5/97) das amostras humanas e animais foram produtoras de AmpC, respectivamente, dentre estes, quatro (66,7%, 4/6) foram co-produtores de ESBL;
- Dois isolados, de origem humana, apresentaram resistência ao ertapenem, indicando possível produção de carbapenemase, considerando o BrCAST.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da portaria lançada no ano de 2018, padronizando o documento do comitê BrCAST para ser utilizado nos laboratórios brasileiros, muitos laboratórios ainda continuam a utilizar os documentos americanos. A esse cenário, encontramos desafios a serem debelados, devido às dificuldades em adquirir os antimicrobianos que apresentam concentrações diferentes do documento do CLSI, e até mesmo a demora de atualização dos painéis de sistemas automatizados. Nos deparamos também com as diferenças nos pontos de corte apresentados em ambos os documentos, dificultando ainda mais a padronização interlaboratorial. E, com a ausência de um documento veterinário, prejudicando a rotina do laboratorista veterinário, uma vez que o profissional precisa se direcionar para referências humanas, ocasionando em uma importante barreira ao conhecimento da real prevalência e epidemiologia da resistência antimicrobiana nacional.

Embora tenha sido detectada baixa resistência nos isolados de origem humana e animal, torna-se preocupante pelo aspecto da Saúde Única, uma vez que os animais domésticos podem ser reservatórios e agentes transmissores para os seres humanos e vice-versa, onde o ambiente também atua de forma potencializadora contribuindo de forma significativa para esta problemática. Sendo assim, nas etapas futuras do estudo será realizada a detecção dos genes *bla*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON Rebecca EV, BOERLIN Patrick. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals and methodologies for their detection. **Can J Vet Res.** 2020;84(1):3-17.

BORTOLAMI A, ZENDRI F, MACIUCA EI, et al. Diversity, Virulence, and Clinical Significance of Extended-Spectrum β -Lactamase- and pAmpC-Producing *Escherichia coli* From Companion Animals. **Front Microbiol.** 2019;10:1260. Published 2019 Jun 5. doi:10.3389/fmicb.2019.01260

BIER, Daniele et al. MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from bovine carcasses. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1373-1379, 2017.

BOERLIN, P.; WHITE, D. G. Resistência antimicrobiana e sua epidemiologia. In: GIGUÈRE, S.; PRECOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D.; DOWLING, P.M. (Org). **Terapia antimicrobiana em medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2010. p.27-34

BRADFORD, Patricia A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.

BRAOIOS, Alexandre et al. Infecções do trato urinário em pacientes não hospitalizados: etiologia e padrão de resistência aos antimicrobianos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 6, p. 449-456, 2009.

BRASIL. 2007. **Resistência microbiana – mecanismos e impacto clínico**. Disponível em <https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm> Acessado em 28/04/2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência a Saúde**. Modulo 10 – Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2020. 160p.: il.10 volumes

BrCAST - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Manual Disco-difusão, 2020**. Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>. Acessado em 19 de fevereiro de 2021.

BrCAST - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Orientações do EUCAST para a Detecção de Mecanismos de Resistência e Resistências Específicas, 2018**. Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>. Acessado em 19 de fevereiro de 2021.

BrCAST - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**. 2020. Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>. Acessado em 19 de fevereiro de 2021.

BrCAST - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Teste de sensibilidade aos antimicrobianos – Método de disco-difusão EUCAST. Versão 6.0, 2017**. Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>. Acessado em 19 de fevereiro de 2021.

BUBERG, May Linn et al. Population structure and uropathogenic potential of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from retail chicken meat. **BMC microbiology**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2021.

BUSH, K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, n.7, p.1085-1089. 2001.

CARVALHO, Vania M. et al. Infecções do trato urinário (ITU) de cães e gatos: etiologia e resistência aos antimicrobianos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 62-70, 2014.

CHANG, Shao-Kuang et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from canine urinary tract infections. **Journal of Veterinary Medical Science**, p. 13-0281, 2014.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30th ed. CLSI supplement M100. 2020.

COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Eurosurveillance**, v. 13, n. 47, p. 19044, 2008.

CORREIA, C.; COSTA, E.; PERES, A.; ALVES, M. (2007). Etiologia das Infecções do Trato Urinário e sua Suscetibilidade aos Antimicrobianos. **Cadernos de Saúde**. 3. 10.34632/cadernosdesaude.2010.3024.

ERSKINE, R. J. et al. Efficacy of systemic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 10, p. 2571-2575, 2002.

ESTRELA, Tatiana S. **Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira**. 2018. Disponível em: https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/22/18_Tatiana_Estrela.pdf. Acessado em 19 de janeiro de 2021

FERNÁNDEZ RIVERÓN, Fernando et al. Resistencia bacteriana. **Revista cubana de medicina militar**, v. 32, n. 1, p. 0-0, 2003.

FLORES-MIRELES, Ana L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269-284, 2015.

FRÈRE, Jean-Marie. Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. **Molecular microbiology**, v. 16, n. 3, p. 385-395, 1995.

GUARDABASSI, Luca; JENSEN, Lars B; KRUSE, Hilde. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. Brasil: Artmed Editora, p.268, 2010.

GUARDABASSI, Luca; COURVALIN, Patrice. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin**, p. 1-18, 2005.

GUPTA, Ekta et al. Emerging resistance to carbapenems in a tertiary care hospital in north India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 124, n. 1, p. 95, 2006.

HOMBACH, Michael; MOUTTET, Brice; BLOEMBERG, Guido V. Consequences of revised CLSI and EUCAST guidelines for antibiotic susceptibility patterns of ESBL-and AmpC β -lactamase-producing clinical Enterobacteriaceae isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 9, p.

HOLMES, ALISON & MOORE, LUKE & SUNDSFJORD, ARNFINN & STEINBAKK, MARTIN & REGMI, SADIE & KARKEY, ABHILASHA & GUERIN, PHILIPPE & PIDDOCK, LAURA. (2015). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**. 387. 10.1016/S0140-6736(15)004

HUR, Brian A. et al. Describing the antimicrobial usage patterns of companion animal veterinary practices; free text analysis of more than 4.4 million consultation records. **Plos one**, v. 15, n. 3, p. e0230049, 2020.

JERICÓ, Márcia Marques; KOGIKA, Márcia Mery; DE ANDRADE NETO, João Pedro. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2015.

JUNIOR, Manuel Alves de Souza; FERREIRA, Edvana dos Santos; CONCEIÇÃO, Gildásio Carvalho da. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **NewsLab**, v. 63, p. 152-174, 2004.

KAPER J.B., NATARO J.P. & MOBLEY H.L.T. 2004. Pathogenic Escherichia coli. **Natl Rev. Microbiol**. 2:123-138.

KASMAR, A. G. & HOOPER, D. Farmacologia das Infecções Bacterianas: síntese da parede celular. In: GOLAN, D. E. (Org) **Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 2ed. p. 562- 578.

KASSIM, Ali et al. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2016.

KLEIN, Roger D.; HULTGREN, Scott J. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 211-226, 2020.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R., W.C. **Diagnóstico Microbiológico**, 7.ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi, p.1860, 2018.

LEZAMETA, Lizet; GONZÁLES-ESCALANTE, Edgar; TAMARIZ, Jesús H. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. **Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Publica**, v. 27, p. 345-351, 2010.

LIVERMORE, David M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.

LONCARIC, Igor et al. Broad-spectrum cephalosporin-resistant and/or fluoroquinolone-resistant enterobacteriales associated with canine and feline urogenital infections. **Antibiotics**, v. 9, n. 7, p. 387, 2020.

Manual BBL® EMB Agar, Modified, Holt-Harris and Teague. Disponível em: <http://www.bd.com/ds/productCenter/221354.asp>. Acessado em novembro de 2020.

Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde, 2004. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf. Acessado em outubro de 2020

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock**-12ª Edição. Artmed Editora, 2010

MOTA, Rinaldo Aparecido et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MOTA, Rinaldo Aparecido et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MURUGAN, M. Senthil et al. Epidemiology of carbapenem-resistant Escherichia coli and first report of blaVIM carbapenemases gene in calves from India. **Epidemiology & Infection**, v. 147, 2019.

NAVARRO, Ferran; MIRÓ, Elisenda; MIRELIS, Beatriz. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 28, n. 9, p. 638-645, 2010.

NOGUEIRA, K. S. Prevalência e caracterização molecular de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) em enterobactérias isoladas no Hospital de Clínicas de Curitiba. **Tese (Ciências Farmacêuticas)**. Universidade Federal do Paraná. 2011.

OLIN, Shelly J.; BARTHES, Joseph W. Urinary tract infections: treatment/comparative therapeutics. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 45, n. 4, p. 721-746, 2015.

O'NEILL, J. Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. **The review on antimicrobial resistance**. 2015. Disponível em: <https://amrreview.org/sites/default/files/Antimicrobials%20in%20agriculture%20and%20the%20environment%20%20Reducing%20unnecessary%20use%20and%20waste.pdf>. Acessado em janeiro de 2021.

PAN-BR. **Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única**. 2018. Disponível em <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/20/af-pan-br-17dez18-20x28-csa.pdf>. Acessado em outubro de 2020

PEREZ, Federico et al. The continuing challenge of ESBLs. **Current opinion in pharmacology**, v. 7, n. 5, p. 459-469, 2007.

POLSFUSS, Silke et al. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and CLSI screening parameters for the detection of extended-spectrum β -lactamase production in clinical Enterobacteriaceae isolates. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 1, p. 159-166, 2012.

REZATOFIGHI, Seyedeh Elham; MIRZARAZI, Mahsa; SALEHI, Mansour. Virulence genes and phylogenetic groups of uropathogenic Escherichia coli isolates from patients with urinary tract

infection and uninfected control subjects: a case-control study. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2021.

ROBBINS, Sarah N. et al. Antimicrobial prescribing practices in small animal emergency and critical care. **Frontiers in veterinary science**, v. 7, p. 110, 2020.

RODRIGUES, Francisco José Barbas; BARROSO, Ana Paula Dias. Etiologia e sensibilidade bacteriana em infecções do tracto urinário. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 123-131, 2011.

RODRIGUES, Naiara Miranda Bento et al. The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification versus biochemical tests: a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. **Brazilian journal of microbiology**, v. 48, n. 1, p. 132-138, 2017.

SANTIAGO, Gabrielli Stefaninni et al. Compreensão de mecanismos fenotípicos e genotípicos relacionados à produção de β -lactamases do tipo AmpC em Enterobacteriaceae. **Tese (Ciências Veterinárias)**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2017.

SANTIAGO, GABRIELLI STEFANINNI. Caracterização da Resistência Antimicrobiana e Estudo Fenogenotípico da Produção de Betalactamases em Enterobactérias Associadas à Etiologia da Mastite Bovina. 67p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)**. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

SANTOS, C. D. M. Staphylococcus sp e Enterobactérias Isoladas de Mastite Recorrente em Oito Rebanhos da Região de Uberlândia – MG: perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. **Dissertação (Ciências Veterinárias)**. Universidade Federal de Uberlândia. 2006.

SCHMITT, Kira et al. Transmission chains of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae at the companion animal veterinary clinic–household interface. **Antibiotics**, v. 10, n. 2, p. 171, 2021.

SILVEIRA, Gustavo Pozza et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006

SMITH, Alison et al. Usage patterns of carbapenem antimicrobials in dogs and cats at a veterinary tertiary care hospital. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 33, n. 4, p. 1677-1685, 2019.

SOUSA, J. C.; PEIXE, L. V.; FERREIRA, H.; PINTO, M. E.; NASCIMENTO, M. S. J.; SOUSA, M. I.; CABRAL, M. Antimicrobianos. In: FERREIRA, W. F. C. & SOUSA, J. C. (Eds) **Microbiologia**. Lisboa: Lidei, 1998. v.1, p. 239-269.

SUKMAWINATA E, Uemura R, Sato W, Thu Htun M, Sueyoshi M. Multidrug-Resistant ESBL/AmpC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Healthy Thoroughbred Racehorses in Japan. **Animals (Basel)**. 2020;10(3):369.

WATTENGEL, Bethany A. et al. 1466. Alkaline Urine: A Cause for Urinary Tract Infection Recurrence. In: **Open Forum Infectious Diseases**. 2019.

WAGENLEHNER FME, CLOUTIER DJ, KOMIRENKO AS, et al : Once-daily plazomicin for complicated urinary tract infections. **N Engl J Med**. 380:729-740, 2019

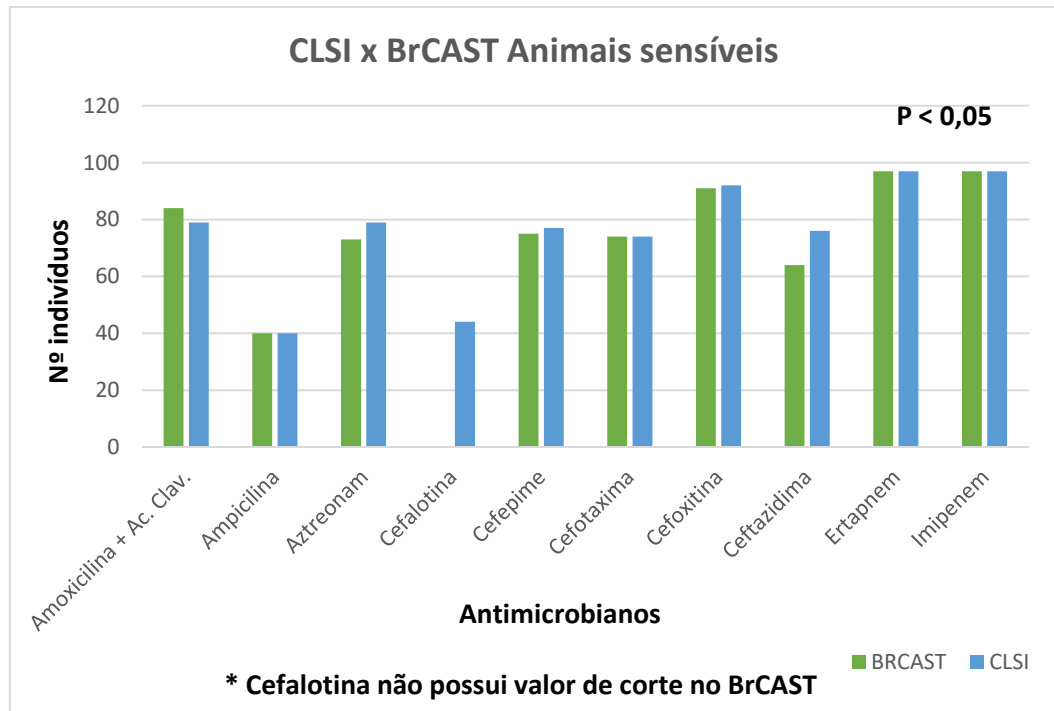
WHITE, Joanna D. et al. Urinary tract infections in cats with chronic kidney disease. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 15, n. 6, p. 459-465, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Critically important antimicrobials for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-human antimicrobial use: report of the second. **WHO Expert Meeting**, Copenhagen, 29-31 May 2000.

8. ANEXOS

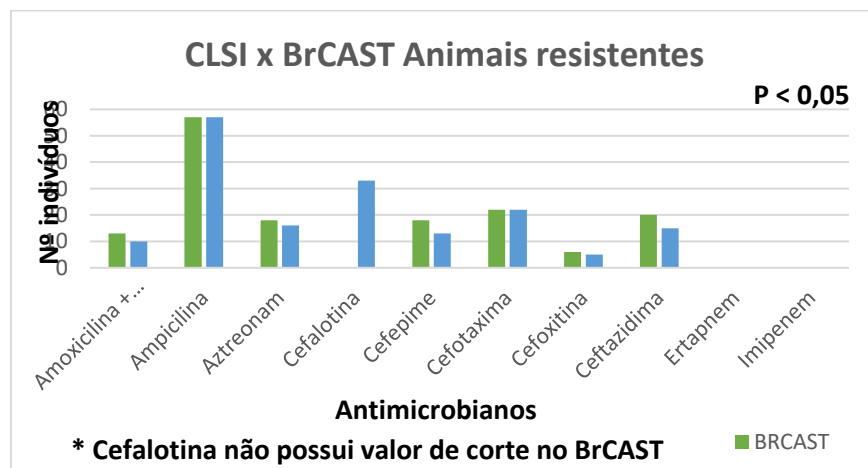
8.1 ANEXO A.

CLSI x BrCAST Animais Sensíveis



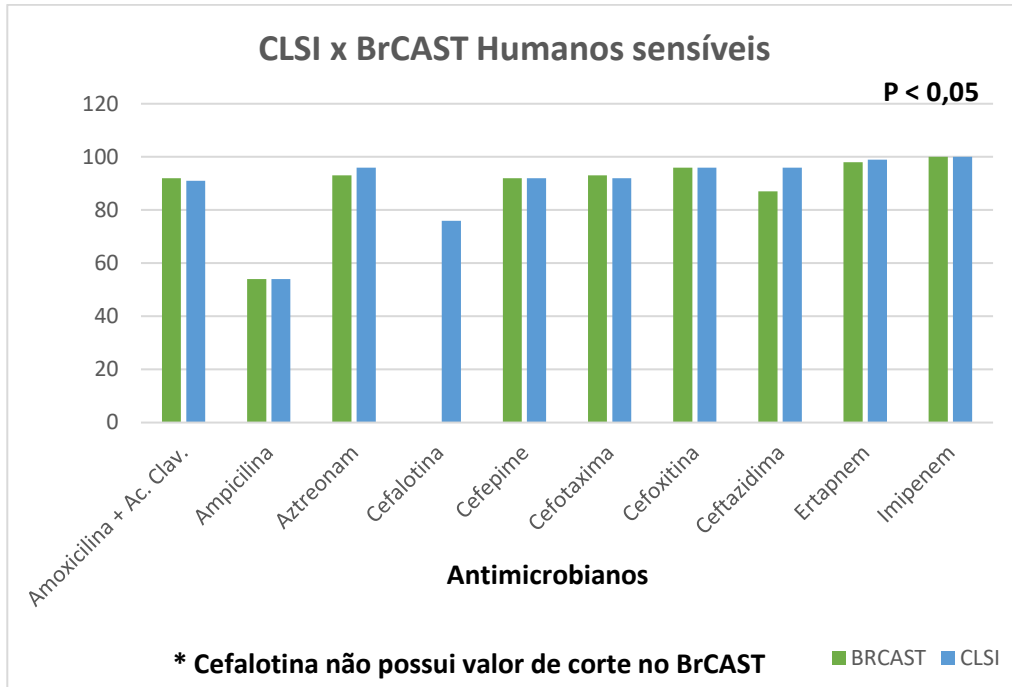
8.2 ANEXO B.

CLSI x BrCAST Animais Resistentes



8.3 ANEXO C.

CLSI x BrCAST Humanos Sensíveis



8.4 ANEXO D.

CLSI x BrCAST Humanos resistentes

