



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CAMPINA GRANDE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL**  
**CAMPUS DE PATOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Perfil de resistência a antimicrobianos e pesquisa de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado em bactérias Gram-negativas de isolados de animais domésticos**

**MEIRE MARIA DA SILVA MACÊDO**

**PATOS-PB**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL**  
**CAMPUS DE PATOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Perfil de resistência a antimicrobianos e pesquisa de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado em bactérias Gram-negativas de isolados de animais domésticos**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Campina  
Grande – UFCG, como parte das  
exigências para a obtenção do título  
de Mestre em Medicina Veterinária.

**MEIRE MARIA DA SILVA MACÊDO**

Prof. Dr. Felício Garino Junior

**Orientador**

**PATOS-PB**

**2015**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG**

M141p

Macêdo, Meire Maria da Silva

Perfil de resistência a antimicrobianos e pesquisa de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado em bactérias Gram-negativas de isolados de animais domésticos / Meire Maria da Silva Macêdo. – Patos, 2015.  
45f.: color.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2015.

"Orientação: Prof. Dr. Felício Garino Junior"

Referências.

1. Enterobacteriaceae; 2. Multirresistentes; 3. *Escherichia coli*;
4. *Klebsiella pneumoniae*; I. Título.

CDU 614.9

## **FICHA DE AVALIAÇÃO**

Nome: Meire Maria da Silva Macêdo

Título: Perfil de resistência a antimicrobianos e pesquisa de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado em bactérias Gram-negativas de isolados de animais domésticos

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

DATA: 24 / 02 / 2015.

### **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Felício Garino Junior (Orientador)**

**Universidade Federal de Campina Grande – Campus Patos-PB**

---

**Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa-UNIVASF (Primeiro Membro)**

**Universidade Federal do Vale do São Francisco – Campus Petrolina -PE**

---

**Prof. Dr. Eldinê Gomes Miranda Neto (Segundo Membro)**

**Universidade Federal de Campina Grande – Campus Patos-PB**

Ao Senhor Deus, por esta  
sempre ao meu lado e por ter  
me dando forças para eu  
chegar até aqui.

Dedico

Ao meu esposo Robério  
Macêdo por ter colaborado  
no trabalho e pelo apoio nas  
horas que mais precisei.

Dedico

Aos meus pais, Antônio Gustavo e  
Maria Silva, por esta sempre ao meu  
lado nos momentos mais difíceis e  
nos momentos alegres da minha  
vida.

Dedico

“Não tenha medo do sofrimento, pois nenhum coração jamais sofreu quando foi em busca dos seus sonhos”.

( Paulo Coelho)

“Se chorei ou se sorri o importante é que emoções eu vivi”.

(Roberto Carlos)



## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, por ter me dado força e saúde, por sempre estar ao meu lado nos momentos difíceis me ajudado a levantar a cabeça, seguir em rente e vencer. Agradeço as oportunidades de aprendizado e sabedoria que sempre encontrei em suas palavras bíblicas, o que fez de me uma mulher de fé e de muita prudência.

Ao meu esposo, Robério Macêdo pela paciência, lealdade e companheirismo e por ser o grande alicerce na minha vida.

Aos meus pais, Antônio Gustavo e Maria Silva, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiando financeiramente.

Aos meus irmãos, Roberto, Carlos, Marizete e Davi.

Aos meus avós paternos, Luis Gustavo e Maria Isabel (*in memoriam*).

Aos meus avós maternos, Alvaro Bezerra e Brazilina Guedes (*in memoriam*).

Ao meu orientador, professor Dr. Felício Garino Junior por sua dedicação, ensinamentos e paciência.

Aos professores, Mateus Matiuzzi e Eldinê Gomes por aceitarem o meu convite para serem meus examinadores a quem tenho admiração pelas suas coerências e ética profissional.

Aos meus amigos, Layze Cilmara, Danielle Pessoa, Rodrigo Antônio e Lylian Karlla, que me ajudaram durante o Mestrado sempre que precisei.

Ao amigo Paulo de Melo Bastos, a sua esposa Jaqueline pelas palavras amigas e ao seu querido filho Paulo de Melo Bastos Filho pelas horas de descontrações e brincadeiras.

Aos meus sogros, Rubens Macêdo e Luzia Cavalcanti pelo apoio e incentivo.

Aos meus sobrinhos, Victor, Higor e Pedro Gabriel e as minhas sobrinhas, Daiane, Thais, Ellen, Maria Luiza, e Alice Gabriela pela descontração de nossas brincadeiras.

Ao funcionário Jonas da pós-graduação de Medicina Veterinária, por sempre me ajudar nas burocracias durante o mestrado e pela sua amizade de sempre.

Ao funcionário José Ednaldo do Laboratório de Microbiologia da Pós-Graduação do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande.

A CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

## RESUMO

Com o objetivo de avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos e pesquisa de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado (ESBL) em bactérias Gram-negativas isoladas de animais domésticos, essa dissertação é composta por dois capítulos. O primeiro capítulo é um estudo da resistência antimicrobiana em bactérias Gram-negativas. O segundo trata-se de uma pesquisa para detecção de ESBL nas espécies bacterianas, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. As bactérias tanto do primeiro como do segundo capítulo foram isoladas de infecções em animais domésticos de diferentes amostras biológicas (fragmentos de órgãos, urina, líquido uterino, fezes, swab auricular, swab nasal, swab ocular, swab de abscesso, swab de plúrio anal, swab vaginal, leite, lavado traqueal, líquido intestinal, efusão pleural e conteúdo pulmonar). No primeiro artigo 190 bactérias Gram-negativas foram isoladas e analisadas, sendo 117 amostras de animais de companhia (cão e gato) e 73 de animais de produção (bovino, equino, caprino, ovino e suíno) durante o período de março de 2013 a agosto de 2014. Após o isolamento estas amostras foram avaliadas através do teste de susceptibilidade *in vitro*, pela técnica de disco difusão em Ágar Müller-Hinton (MH), frente a 19 classes de antibióticos: gentamicina (10  $\mu$ g), amicacina (30  $\mu$ g), cloranfenicol (30  $\mu$ g), neomicina (10  $\mu$ g), norfloxacinina (10  $\mu$ g), kanamicina (30  $\mu$ g), tetraciclina (30  $\mu$ g), amoxicilina/ácido clavulânico (10  $\mu$ g), aztreonam (30  $\mu$ g), ceftiofor (30  $\mu$ g), cefotaxima (30  $\mu$ g), cefepime (30  $\mu$ g), cefalotina (30  $\mu$ g), cefalexina (30  $\mu$ g), cefoxitina (30  $\mu$ g), ceftazidima (30  $\mu$ g), para verificação da resistência antimicrobiana. Nos resultados obtidos varias bactérias apresentaram múltiplas resistências, principalmente para o antibiótico tetraciclina e para o grupo das cefalosporinas. Na segunda pesquisa foram avaliadas 100 enterobactérias (60 *E. coli* e 40 *K. pneumoniae*), onde foram utilizados dois testes fenotípicos, aproximação em discos, com a utilização dos discos dos seguintes antibióticos: amoxicilina/ácido clavulânico (10  $\mu$ g), aztreonam (30  $\mu$ g), ceftazidima (30  $\mu$ g), cefotaxima (30  $\mu$ g) e cefepime (30  $\mu$ g) e a fita de gradiente antimicrobiano Etest de concentrações crescentes de ceftazidima (0,5g/ml a 32g/ml) em uma das extremidade e concentrações crescentes de ceftazidima (0,064g/ml a 4g/ml) associadas a uma concentração fixa de ácido clavulânico (4g/ml) na outra extremidade. Foi observado que as estipes que foram produtoras de ESBL apresentaram resistência para mais de 4  $\beta$ -lactâmicos testados simultaneamente, principalmente para as cefalosporinas e aztreonam. Todos os testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Pós-

graduação em Medicina Veterinária do Hospital Veterinário (HV), do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Nas três metodologias utilizadas neste estudo, os inóculos bacterianos foram preparados individualmente em caldo MH e a turbidez ajustada a 0,5 da escala de McFarland. No primeiro estudo, conclui-se que existe uma ampla variedade de bacterianas Gram-negativas envolvidas nas diversas infecções de animais domésticos, onde estas bactérias apresentaram uma ampla múltipla resistência para diferentes classes antimicrobianas. Na segunda pesquisa houve uma detecção bastante significativa de enterobactérias produtoras de ESBL nessas infecções de animais domésticos, sendo visto também que os dois testes utilizados se mostraram eficientes.

**Palavras-chave:** Enterobacteriaceae, múltipla resistência, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

## ABSTRACT

In order to evaluate the antimicrobial resistance profile and  $\beta$ -lactamase research extended spectrum (ESBL) in Gram-negative bacteria isolated from domestic animals, this thesis consists of two chapters. The first chapter is a study of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. The second it is a search for the detection of ESBL in bacterial species, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Bacteria both the first and the second section were isolated infections in domestic animals of different biological samples (fragments organs, urine, uterine fluid, feces, ear swabs, nasal swabs, ocular swab, swab abscess, anal swab plurido, vaginal swab, milk, tracheal aspirates, intestinal fluid, pleural effusion and pulmonary content). In the first article 190 Gram - negative bacteria were isolated and analyzed, and 117 samples of pet (dog and cat) and 73 of farm animals (bovine, equine, goats, sheep and pigs) during the period from March 2013 to August 2014. After isolation these samples were evaluated by in vitro susceptibility testing by disk agar diffusion technique Muller-Hinton (MH) compared to 19 classes of antibiotics: gentamicin (10  $\mu$ g), amikacin (30  $\mu$ g), chloramphenicol (30  $\mu$ g), neomycin (10  $\mu$ g), norfloxacin (10  $\mu$ g), kanamycin (30  $\mu$ g), tetracycline (30  $\mu$ g), amoxicillin/clavulanic acid (10  $\mu$ g), aztreonam (30  $\mu$ g) , ceftiofor (30  $\mu$ g) , cefotaxime (30  $\mu$ g), cefepime (30  $\mu$ g), cephalothin (30  $\mu$ g), cephalexin (30  $\mu$ g), ceftazidime (30  $\mu$ g) for verification of antimicrobial resistance. The results obtained various bacteria presented multiple resistance, especially to the antibiotic tetracycline and the group of cephalosporins. In the second study were evaluated 100 enterobacteria (*E. coli* 60 and 40 *K. pneumoniae*), where we used two phenotypic tests, disks approximation, using the discs of the following antibiotics: amoxicillin/clavulanic acid (10  $\mu$ g), aztreonam (30  $\mu$ g), ceftazidime (30  $\mu$ g), cefotaxime (30  $\mu$ g) and cefepime (30  $\mu$ g) and Etest antimicrobial tape gradient of increasing concentrations of ceftazidime (0.5 g / ml to 32g / ml) in one end and concentrations increasing ceftazidime (0,064g /ml to 4 g/mL) associated with a fixed concentration of clavulanic acid (4g/ ml) at the

other end. It was observed that the stems that were ESBL producers were resistant to more than 4  $\beta$ -lactams tested simultaneously, particularly for cephalosporins and aztreonam. All tests were performed at the Graduate Microbiology Laboratory of Veterinary Medicine Veterinary Hospital (HV), the Center for Health and Rural Technology (CSTR) at the Federal University of Campina Grande (UFCG). In the three methods used in this study, bacterial inocula were prepared individually in MH broth and turbidity adjusted to 0.5 on the McFarland scale. In the first study it is concluded that there is a wide variety of gram-negative bacteria involved in many infections of domestic animals where these bacteria showed a wide resistance to multiple antimicrobial different classes. In the second study, there was a very significant detection of ESBL-producing Enterobacteriaceae such domestic animal infections, and is also seen that the two tests have proved efficient .

**Keywords:** Enterobacteriaceae, multidrug-resistant, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>II</b>
<b>LISTA DE QUADROS .....</b>	<b>III</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>18</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO I - Perfil de resistência antimicrobiana em bactérias gram-negativas isoladas de animais domésticos .....</b>	<b>20</b>
RESUMO .....	21
ABSTRACT.....	22
INTRODUÇÃO .....	23
MATERIAL E MÉTODOS .....	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
CONCLUSÕES.....	29
REFERÊNCIAS .....	29
<b>CAPÍTULO II - Pesquisa de <math>\beta</math>-lactamase de espectro estendido (ESBL) em cepas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> de isolados de animais domésticos .....</b>	<b>34</b>
ABSTRACT.....	35
RESUMO.....	35
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS .....	36
RESULTADOS .....	37
DISCUSSÕES .....	38
REFERÊNCIAS.....	40
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>44</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Frequência absoluta da resistência antimicrobiana frente à tetraciclina e aos  $\beta$ -lactâmicos das estirpes bacterianas Gram-negativas isoladas em animais de companhia e animais de produção no Hospital Veterinário da UFCG, Paraíba, Brasil, 2015.....26

**Figura 2.** Análise da frequência absoluta dos materiais biológicos dos 190 isolados de bactérias Gram-negativas dos animais domésticos atendidos no Hospital Veterinário da UFCG, Paraíba, Brasil, 2015.....28

### CAPÍTULO II

**Figura 1:** Análise quantitativa do perfil de resistência das 100 estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas de animais domésticos.....42

**Figura 2:** Análise da frequência absoluta da produção de ESBL das 100 estirpes (60 *E. coli* e 40 *K. pneumoniae*) isoladas de animais de companhia e animais de produção, testadas no teste de aproximação dos discos e na Fita Etest ESBL.....42

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Frequência relativa e absoluta de bactérias Gram- negativas isoladas de animais de companhia e animais de produção atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2015.....24
- Tabela 2.** Avaliação da susceptibilidade *in vitro* de 190 cepas de bactérias Gram negativas isoladas de animais domésticos atendidos no Hospital Veterinário da UFCG, Paraíba, Brasil, 2015.....25
- Tabela 3.** Resultados das 190 amostras de bactérias Gram-negativas que apresentaram múltipla resistência, Paraíba, Brasil, 2015.....27



## LISTA DE QUADRO

### CAPÍTULO II

<b>Quadro 1:</b> Resultado da produção de ESBL em isolados de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> em animais de companhia e animais de produção, mediante a utilização dos testes de Disco aproximação e Etest para ESBL.....	43
--	----

## INTRODUÇÃO GERAL

As taxas de resistência as drogas antimicrobianas em animais domésticos têm se elevado ao longo dos anos, tornando-se um problema efetivo na saúde pública (Werckethin et al., 2001). O monitoramento da resistência bacteriana e a pesquisa de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL de interesse clínico contribuem para delinear a amplitude do problema e para definir opções de tratamento e medidas adequadas para barrar este fenômeno (Luzzaro, 2006). Tendo em vista o aumento de micro-organismos multirresistentes, a utilização dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos são instrumentos muito úteis para avaliar esses patógenos. Diante deste fato o capítulo I deste estudo teve como objetivo avaliar o perfil de resistência antimicrobiana *in vitro* de isolados bacterianos provenientes de animais domésticos atendidos nas Clínicas Médicas do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

Existe uma grande variedade de mecanismos de resistência aos antibióticos, principalmente aos  $\beta$ -lactâmicos, um dos mais importantes é a produção de  $\beta$ -lactamases, que são enzimas capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico de penicilinas, cefalosporinas e outros antimicrobianos relacionados, os tornando inativos. Dentre estes mecanismos destacamos a produção de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (Extended-Spectrum Betalactamase = ESBL) existente principalmente em algumas espécies de bactérias Gram-negativas (Freitas et al., 2003). A detecção destas enzimas já foi observada em diversas famílias, principalmente na Enterobacteriaceae, onde as principais produtoras de ESBL são a *Escherichia coli* e a *Klebsiella pneumoniae*.

As ESBLs representam o maior grupo de  $\beta$ -lactamases estudado no mundo e têm sido motivo de extensivas investigações microbiológicas, bioquímicas, genéticas e epidemiológicas em vários trabalhos nos últimos anos (Bush et al., 2012; Lima et al., 2011; Souza & Pitondo-Silva, 2008). Essa enzima tem uma variável expressão fenotípica, pois enquanto uma pode ter maior capacidade para hidrolisar drogas como a ceftazidima ou aztreonam, outra pode ter maior capacidade para hidrolisar a ceftriaxona ou a cefotaxima. Por este motivo a detecção laboratorial de cepas produtoras de ESBL se torna muito desafiadora, pois são necessários múltiplos substratos de detecção específicos (Reis et al., 1998). Diante do exposto, o capítulo II desta dissertação teve como objetivo verificar a presença de cepas produtoras de ESBL nas espécies bacterianas *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, isoladas de amostras clínicas de animais

domésticos atendidos em um Hospital Veterinário de ensino, bem como verificar também a eficiência dos dois testes fenotípicos utilizados para a detecção de ESBL.

## REFERÊNCIAS

FREITAS, A.L.P.; MACHADO, D.P.; SOARES F.S.C. & BARTH A.L. 2003. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella* spp and *Escherichia coli* Obtained in a Brazilian Teaching Hospital: Detection, Prevalence and Molecular Typing. **Braz. J. of Microbiol.** 34: 344-348.

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

LUZZARO, F.; MEZZATESTA, M.; MUGNAIOLI, C.; PERILLI, M.; STEFANI, S.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINE, G.M. & TONIOLO A. 2006. Trends in Production of Extended-Spectrum-Lactamases among Enterobacteria of Medical Interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey. **J. Clin. Microbiol.** 44:1659-1664. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672390> Acessado em: 02/01/2015.

REIS, A.O.; GALES, A.C. & SADER, H.S. 1998. Avaliação da acurácia do teste de adição clavulanato em disco para a detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL. **J. Bras. Patol.** 34: 85-93.

SOUZA, R.R. & PITONDO-SILVA, A. 2008. Multilocus Sequence Typing para identificação de linhagens atípicas de *Yersinia*. In: Congresso Brasileiro de Genética, 54, 2008, Salvador, Bahia **Anais...**Salvador, Bahia.

WERCKENTHIN, C.; CARDOSO, M.; MARTEL J.L.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in Staphylococci from animal with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. **Vet. Res.** v.32, p.341-362, 2001.

## **CAPÍTULO I**

### **Perfil de resistência antimicrobiana em bactérias gram-negativas isoladas de animais domésticos, em Hospital Veterinário de Ensino**

Manuscrito submetido à Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia/UFMG (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*) – Belo Horizonte, MG.

## **Perfil de resistência antimicrobiana em bactérias Gram-negativas isoladas de animais domésticos, em Hospital Veterinário de Ensino**

[Antimicrobial resistance profile of Gram-negative bacteria isolated from domestic animals]

M.M.S. Macêdo,<sup>1\*</sup> L. C.A. Silva<sup>1</sup>; R.M. Oliveira<sup>1</sup>, R.A. T. Matos<sup>1</sup>, D. A.N. Pessoa<sup>1</sup>, L. S. A. Silva<sup>2</sup>, F. Garino Junior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Campina Grande – Patos, PB

<sup>2</sup>Universidade Federal de Campina Grande – Campina Grande, PB

### **RESUMO**

Objetivou-se com este estudo avaliar a resistência antimicrobiana *in vitro* de 190 isolados clínicos de bactérias Gram-negativas provenientes de diferentes amostras biológicas (fragmentos de órgãos, urina, líquido uterino, fezes, swab auricular, swab nasal swab ocular, swab de abscesso swab de plúrio anal, swab vaginal, leite, lavado traqueal, líquido intestinal, efusão pleural e conteúdo pulmonar) de animais atendidos nas clínicas médicas do Hospital veterinário da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Dos 190 isolados, 43,6% foram *Escherichia coli*, 24,7% *Klebsiella pneumoniae*, 16,3% *Pseudomonas aeruginosa*, 4,7% *Klebsiella oxitoca*, 3,7% *Serratia liquefaciens*, 2,7% *Moraxella canis*, 2,1% *Salmonella entérica*, 2,1% *Proteus mirabilis*. Para o estudo do perfil de resistência frente a 19 classes de antibióticos: amicacina (30 µg), gentamicina (10 µg), kanamicina (30 µg), neomicina (10 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (10 µg), ampicilina (30 µg), ceftiofor (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefepime (30 µg), cefalotina (30 µg), cefalexina (30 µg), cefoxitina (30 µg), ceftazidima (30 µg), imipenem (30 µg), enrofloxacina (30 µg), norfloxacina (10 µg), tetraciclina (30 µg), polimixina B 300 U e cloranfenicol (30 µg), empregou-se o teste de susceptibilidade *in vitro* através da técnica de difusão em discos. Onde 88,55% dos isolados, apresentaram múltipla resistência para mais de uma classe de antimicrobianos. Os maiores índices de resistências apresentados foram para tetraciclina (74,8%) e para maioria das cefalosporinas: cefalotina (57,9%), cefotaxima (54,8%), cefalexina (54,2%), cefoxitina

---

<sup>1</sup>\*E-mail:meiremacedo@yahoo.com.br

(51,5%) e ceftazidima (43,7%). Portanto, este trabalho conclui que existe uma ampla variedade de isolados bacterianos Gram-negativos multirresistentes envolvidas em infecções de animais de companhia e de produção. Um fator real de muita importância, uma vez que a múltipla resistência aos antimicrobianos pode dificultar a escolha do medicamento na terapia desses micro-organismos, além de poder ser potencialmente transmitidas ao homem, através de alimentos e do seu contato direto com animais.

Palavras-chave: Antimicrobianos, múltipla resistência, eficácia, isolados bacterianos.

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate antimicrobial resistance *in vitro* of 190 clinical isolates of Gram-negative bacteria from different biological samples (organ fragments, urine, uterine fluid, feces, ear swab, nasal swab, eye swab, abscess swab, anal swab, vaginal swab, milk, washed tracheal, intestinal fluid, pleural effusion, pulmonary content) of animals treated at medical clinics veterinary Hospital of the Federal University of Campina Grande (UFCG). Of the 190 isolated, 43,6% *Escherichia coli*, 24,7% *Klebsiella pneumoniae*, 16,3% *Pseudomonas aeruginosa*, 4,7% *Klebsiella oxitoca*, 3,7% *Serratia liquefaciens*, 2,7% *Moraxella canis*, 2,1% *Salmonella entérica*, 2,1% *Proteus mirabilis*. To study the sensitivity profile assessed at 19 antimicrobials, we used the technique of *in vitro* diffusion disks. 88.55% of the strains showed multiple resistance to two or more antibiotics. The highest rates of resistance has been shown to tetracycline (74,8%) and most cephalosporins: cephalothin (57,9%), cefotaxime (54,8%), cephalexin (54,2%), cefoxitin (51,5 %). Amikacin (58,4%) and gentamicin (48,9%) were the antimicrobials that played better sensitivity and imipenem had the highest intermediate sensitivity index (26,3%). This study therefore concludes that there is a wide variety of bacterial strains multiresistant Gram-negative involved in companion animals and production conditions. A real factor of great importance, since the multiple antimicrobial resistance may hinder the choice of medication in the therapy of these micro-organisms, and can potentially be transmitted to humans through food and its direct contact with animals. Emphasizing the importance of bacterial identification and antibiotic susceptibility of achievement to be able to make appropriate treatment in major diseases of domestic animals.

Keywords: Antimicrobial, multiple resistance, effectiveness, bacterial strains.

## INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana é uma preocupação mundial tanto na medicina veterinária como na medicina humana, sendo este um problema complexo que envolve várias espécies bacterianas e seus diferentes mecanismos de resistência, que pode muitas vezes ser transferida de uma bactéria a outra (Guardabassi et al., 2004; Mendes et al., 2005). Na mesma rapidez com que os novos agentes antimicrobianos são descobertos, as bactérias vêm demonstrando uma notável habilidade de desenvolver resistência a esses agentes (Sanchez et al., 2002). Muitas vezes pesquisas de novos antibióticos são abandonadas frente à alta crise de endemicidade de bactérias resistentes, e até mesmo alguns desses fármacos têm fracassado antes mesmo de sua comercialização (Castanheira et al., 2008).

As taxas de resistência aos antibióticos em animais domésticos se elevaram ao longo dos anos (Witte, 1999; Werckethin et al., 2001), e esse aumento acompanhou a utilização dos antimicrobianos no tratamento de infecções nos animais, os fármacos de amplo espectro sem conhecimento da sua real necessidade, já que exames para a identificação bacteriana e a sua susceptibilidade aos agentes antimicrobianos muitas vezes não são realizados (Guardabassi et al., 2004; Guardabassi et al., 2008). Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são amplamente utilizados na medicina veterinária, principalmente nos tratamentos de infecções causadas por *Escherichia coli* em cães e gatos (Okubo, 2014). O uso inadequado desses antimicrobianos no tratamento de infecções em animais de companhia, como cães e gatos é alvo de diversas críticas, pois pode estar colaborando para o desenvolvimento de resistência bacteriana entre humanos e animais através do contato direto entre eles e seus proprietários (Pedersen et al., 2007; Pallo-Zimmerman et al., 2010).

Tendo em vista que os testes de susceptibilidade *in vitro* frente aos antimicrobianos são instrumentos muito úteis para avaliar o desenvolvimento de resistência em patógenos bacterianos infecciosos, onde muitas vezes as indicações terapêuticas são realizadas de forma empírica (Andrade et al., 2000; Barberio et al., 2002), objetivou-se com este estudo avaliar o perfil de resistência antimicrobiana *in vitro* de isolados bacterianos provenientes de animais domésticos atendidos nas Clínicas Médicas do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram isoladas e analisadas 190 bactérias Gram-negativas (173 de animais de companhia e 73 de animais de produção) durante o período de março de 2013 a agosto de 2014 de diversas amostras biológicas (45 fragmentos de órgãos, 20 amostras de urina, 19 de líquido uterino, 18 de fezes, 16 de swab auricular, 16 swab nasal, 19 swab ocular, 10 swab de abscesso cutâneo, 3 swab de plúrio anal, 3 swab vaginal, 8 de leite, 3 lavado traqueal, 3 líquido intestinal, 3 efusão pleural e 4 conteúdo pulmonar) provenientes de animais domésticos atendidos nas Clínicas Médicas do Hospital Veterinário (HV) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). O processamento deste material, como o isolamento, identificação e perfil de susceptibilidade *in vitro* a antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Microbiologia da mesma instituição.

A identificação foi realizada através de exames microbiológicos. As amostras foram semeadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) e em placas de Petri contendo os meios Ágar sangue ovino desfibrinado a 5% e Ágar MacConkey. Após o cultivo as placas foram incubadas à temperatura de 37°C em aerobiose por 24-72 horas para verificação do crescimento bacteriano. As colônias foram submetidas ao exame bacterioscópico pelo método de coloração de Gram e identificadas através das provas bioquímicas: TSI, Motilidade, Malonato, Produção de Indol, Produção de Urease, Produção de Gelatinase, Produção de fenilalanina desaminase, utilização de Citrato, Reação de Vermelho de Metila (VM) e Voges-Proskauer (VP), fermentação da Lactose, Hidrólise de Esculina e redução de Nitrato, segundo Murray et al. (1999).

Para a avaliação da susceptibilidade *in vitro*, foi utilizado o método de disco difusão em Ágar Müller-Hinton (MH), preconizado pela técnica de Bauer et al. (1966), conforme o recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI) (CLSI, 2005). Foram avaliados 19 classes de antibióticos apresentados na Tab. 2. Como cepa controle para o teste de difusão dos discos foi utilizada a *Escherichia coli* ATCC® 25922.

A análise estatística foi do tipo descritiva, calculando-se as frequências absoluta e relativa (Sampaio 1998).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 190 isolados de bactérias Gram-negativas, foram identificadas 43,6% (83/190) *Escherichia coli*, 24,7% (47/190) *Klebsiella pneumoniae*, 16,3% (31/190) *Pseudomonas aeruginosa*, 4,7% (9/190) *Klebsiella oxitoca*, 3,7% (7/190) *Serratia liquefaciens*, 2,7% (5/190) *Moraxella canis*, 2,1% (4/190) *Salmonella entérica*, 2,1% (4/190) *Proteus mirabilis*. Das 117 amostras de animais de companhia 50 isolados foram de *E. coli*, sendo a bactéria mais frequente, seguida por 28 isolados de *K. pneumoniae*, 17 de *P. aeruginosa*, oito *K. oxitoca*, seis *S. liquefaciens*, cinco *M. canis* e três *P. mirabilis*. E das 73 amostras de animais de produção, 36 isolados foram de *E. coli*, sendo ela também a bactéria mais frequente, seguida de 19 *K. pneumoniae*, 14 *P. aeruginosa*, quatro *Serratia entérica*, uma *K. oxitoca*, uma *S. liquefaciens*, e um *P. mirabilis*, dados descritos na Tab. 1.

Tabela 1. Frequência relativa e absoluta de bactérias Gram- negativas isoladas de animais de companhia e animais de produção atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2015.

Agentes	Animais de companhia	Animais de produção	Frequência absoluta	Frequência relativa
<i>Escherichia coli</i>	50	33	83	43,6%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28	19	47	24,7%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17	14	31	16,3%
<i>Klebsiella oxitoca</i>	8	1	9	4,7%
<i>Serratia liquefaciens</i>	6	1	7	3,7%
<i>Moraxella canis</i>	5	0	5	2,6%
<i>Salmonella enterica</i>	0	4	4	2,2%
<i>Proteus mirabilis</i>	3	1	4	2,2%
<b>Total de amostras</b>	<b>117</b>	<b>73</b>	<b>190</b>	<b>100%</b>

Estudos têm apontado um aumento na resistência de bactérias Gram-negativas isoladas de animais de produção, principalmente as da família Enterobacteriaceae, ocasionando impacto no agronegócio (Medina et al., 2011; Silva & Licopan, 2012). A *E. coli* é uma das bactérias responsáveis pelo maior número de causas de infecções em animais de produção, sendo o maior agente causador de diarreia em bezerros. Além disso este patógeno vêm apresentando elevados índices de resistências, sendo esta bactéria descrita como uma das bactérias mais produtoras de ESBL. Nos resultados encontrados

neste estudo a *E.coli* foi o principal agente encontrado tanto nas amostras de animais de produção como em animais de companhia.

Os maiores índices de resistência das amostras foram apresentados para o antimicrobiano tetraciclina (74,8%) e para maioria das cefalosporinas: cefalotina (57,9%), cefotaxima (54,8%), cefalexina (54,2%), ceftiofina (51,5%), ambas com valores acima de 50% de resistência, assim também como para ampicilina (54,7%) resultados observados na Tab. 2. Shluter et al. (2014) também observou uma grande variedades de bactérias isoladas de animais domésticos com a presença de resistência à tetraciclina.

Tabela 2. Avaliação da susceptibilidade *in vitro* de 190 cepas de bactérias Gram negativas isoladas de animais domésticos atendidos no Hospital Veterinário da UFCG, Paraíba, Brasil, 2015.

<b>Antimicrobianos</b>	<b>Sensível</b>	<b>Intermediário</b>	<b>Resistente</b>
<b>Aminoglicosídeos</b>			
Amicacina (30 µg)	58,4%	17,4%	24,2%
Gentamicina (10 µg)	48,9%	11,6%	38,9%
Kanamicina (30 µg)	36,3%	14,7%	49%
Neomicina (30 µg)	35,3%	16,8%	47,9%
<b>β-lactâmicos</b>			
Amoxicilina/Clavulanato (20 µg)	44,2%	12,1%	43,7%
Ampicilina (30 µg)	33,7%	11,6%	54,7%
Cefalexina (30 µg)	34,2%	11,6%	54,2%
Cefalotina (30 µg)	33,7%	8,4%	57,9%
Cefepime (30 µg)	31,1%	18,4%	50,5%
Cefotaxima (30 µg)	32,1%	13,1%	54,8%
Ceftiofina (30 µg)	33,7%	14,8%	51,5%
Ceftazidima (30 µg)	28,9%	27,4%	43,7%
Ceftiofur (30 µg)	33%	14%	53%
Imipenem (30 µg)	47,4%	26,3%	26,3%
<b>Quinolonas</b>			
Enrofloxacina (30 µg)	35,3%	15,8%	48,9%
Norfloxacina (10 µg)	63,1%	7,9%	29%
<b>Outros</b>			
Clorafenicol (30 µg)	34,7%	12,3%	53%
Polimixina B	59,4%	12,6%	28%
Tetraciclina (30 µg)	18,4%	6,8%	74,8%

No trabalho realizados por Ishii et al. (2011) verificou-se uma alta porcentagem de resistência aos antibióticos testados *in vitro* nas afecções do trato urinário por bactérias

Gram-negativas isoladas de cães e gatos, no estado do Paraná, sendo verificado uma resistência de 83% para tetraciclina e 62% para ampicilina, resultados próximos aos obtidos no presente estudo para os mesmos antimicrobianos.

A elevada prevalência de amostras simultânea resistência à tetraciclina e aos  $\beta$ -lactâmicos demonstrada nesta pesquisa, pode estar associado ao uso frequente ou mesmo a subdosagens desses antimicrobianos na terapia das enfermidades tanto em animais de companhia como em animais de produção, índices mostrados na (Fig. 3).

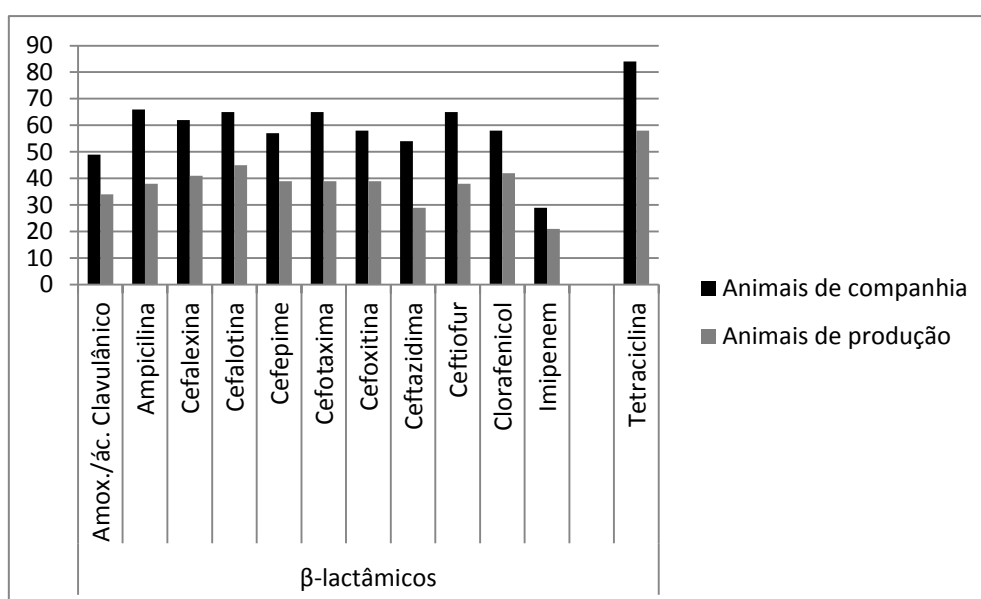


Figura 1. Frequência absoluta da resistência antimicrobiana frente à tetraciclina e aos 11  $\beta$ -lactâmicos testados nas estirpes bacterianas Gram-negativas isoladas em animais de companhia e animais de produção no Hospital Veterinário da UFCG, Paraíba, Brasil, 2015.

Karczmarczyk et al. (2011), em estudo com 74 isolados de *E. coli* obtidas de animais domésticos no Hospital Veterinário da Universitário da Irlanda, verificaram a resistência para tetraciclina e ampicilina com índices acima de 70%, demonstrando a alta resistência para estes dois antimicrobianos. Os mesmos autores relatam a múltipla resistência de cinco a 15 clases antimicrobianas para esta bactéria. Um outro fator verificado No presente estudo, um fator verificado foi a presença de múltipla resistência a dois ou mais antimicrobianos, onde das 190 amostras isoladas, 179 (88,55%) foram multirresistentes, resultados descritos na Tab. 3.

Em três isolados de *E. coli* (1,6%) foi verificado resistência para os 19 antimicrobianos testados. Esse achado representa um motivo de preocupação, pois o fato é que muitos antimicrobianos disponíveis no mercado não teriam efeito sobre tais micro-organismos, com isto pode vir acarretar enormes dificuldades nos tratamentos dos animais com infecções e, conseqüentemente, agravar as perdas econômicas principalmente em animais de produção, levando estes animais a morte, bem como diminuindo as chances de cura nos animais de companhia.

Tabela 3. Resultados das 190 amostras de bactérias Gram-negativas que apresentaram múltipla resistência, Paraíba, Brasil, 2015.

Nº de Múltiplas resistências	Nº de Amostras	Frequência relativa
19 Antimicrobianos	3	1,6%
18 Antimicrobianos	4	2,1%
17 Antimicrobianos	7	3,7%
16 Antimicrobianos	11	5,8%
15 Antimicrobianos	11	5,8%
14 Antimicrobianos	10	5,3%
13 Antimicrobianos	12	6,3%
12 Antimicrobianos	8	4,2%
11 Antimicrobianos	11	5,8%
10 Antimicrobianos	12	6,3%
9 Antimicrobianos	11	5,8%
8 Antimicrobianos	11	5,8%
7 Antimicrobianos	8	4,2%
6 Antimicrobianos	7	3,7%
5 Antimicrobianos	11	5,8%
4 Antimicrobianos	8	4,2%
3 Antimicrobianos	13	6,8%
2 Antimicrobianos	21	11,05%
<b>Total</b>	<b>179</b>	<b>88,55%</b>

Dentre os isolados de *K. pneumoniae* sete (3,7%) foram resistentes para dezessete antimicrobianos. Resultados semelhantes foram descritos na Itália por Donati et al., (2014) que identificou um número considerável de cepas de *Klebsiella* spp. multirresistentes em isolados de animais de companhia. Esta bactéria está presente principalmente em infecções relacionada a infecções do sistema respiratório. Onde neste

estudo seu isolamento foi proveniente principalmente de fragmentos de órgãos, como o pulmão, de swab nasal e conteúdo pulmonar.

Brisse e Duijkeren (2005), em uma pesquisa com 100 estirpes de *Klebsiella* spp. isoladas de animais, obtiveram os maiores índices de resistência para ampicilina (99%) e cefalexina (43%), onde 30 isolados apresentaram múltipla resistência para três ou mais antimicrobianos. Os valores de resistência da cefalexina (54,2%) do presente trabalho são próximos dos obtidos pelos autores acima citado. Entretanto os valores da ampicilina (54,7%) foram divergentes.

É importante ressaltar que o uso inadequado de antimicrobianos pode favorecer a redução da sua eficácia. Por este motivo, o ideal é ser seguido um protocolo terapêutico baseado em exames laboratoriais, como a aplicação do antibiograma na rotina laboratorial, para a indicação correta do antimicrobiano de eleição eficaz, para o tratamento da infecção, com o propósito de sucesso terapêutico e minimizar assim a resistência bacteriana.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo revelam que a presença de isolados multirresistentes é um fator real de muita importância, uma vez que a múltipla resistência aos antimicrobianos pode dificultar a escolha do medicamento na terapia desses microorganismos, podendo ser potencialmente transmitidas ao homem através de alimentos e do seu contato direto com animais. Ressaltando a importância da identificação bacteriana e do monitoramento dos antimicrobianos e da realização de antibiogramas para poder efetuar um tratamento apropriado nas principais infecções dos animais domésticos.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, M.A.; DIAS FILHO, F.C.; MESQUISTA, A.J. et al. Sensibilidade “*in vitro*” de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. *Ciê. Anim. Bras.*, v.1, n.1, p.53-57, 2000.

BARBERIO, A.; GIET, L. H.; DALVIT, P. “In vitro” sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. *Napgama*, v.5, n.1, p.10, 2002.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.45, n.4, p.493-496, 1966.

BRISSE S, DUIJKEREN, E. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* spp. animal clinical isolates. *Veter. Microbiology*. v.25, n.105 (3-4), p.307-12, 2005.

CASTANHEIRA, M.; SADER, H.S; DESHPANDE, L.M. et al. Antimicrobial Activities of Tigecycline and Other Broad-Spectrum Antimicrobials Tested against Serine Carbapenemase and Metallo-Beta-lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Age. and Chemoter.*, v.52, n.2, p.570-573, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18070960>>. Acessado em: 01 dez. 2014.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fiftenth Informational Supplement. CLSI document M 100-S 15 (ISBN 1-56238-556-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road. Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

CORTÉS, P.; Blanco, V.; Mora, A. et al. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.76, p.27799-2805, 2010.

DONATI, V. FELTRIN, F. HENDRIKSEN, R.S. et al. Extended-Spectrum-Beta-Lactamases, AmpC Beta-Lactamases and plasmid Mediated Quinolones Resistance in *Klebsiella* spp. from Companion Animals in Italy. *Plos One*, v.9, n.3, 90564, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3942433/>>. Acessado em: 28 nov. 2014.

GALES, A. C.; JONES, R.N.; GORDON, K.A. et al. Activity and spectrum of 22 antimicrobial agents tested against urinary tract infection pathogens in hospitalized

patiens in Latin America: report from the second year of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998). *Emerg. Infect. Dis.*, v. 45, n.3, p. 295-303, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10702547>>. Acessado em: 19 dez. 2014.

GUARDABASSI L.; SCHWARZ S.; LLOYD D. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:321-332, 2004.

GUARDABASSI L.; HOUSER G.A.; FRANK L.A.; PAPICH M.G. Orientações para o uso de antimicrobianos em cães e gatos. In: *Guia de Antimicrobianos em Veterinária*. Artmed, p.224-249, Porto Alegre, 2008.

ISHII, J. B.; FREITAS, J. C.; ARIAS, M. V.B. Resistência de bactérias isoladas de cães e gatos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (2008-2009). *Pesq. Vet. Bras.* v.31, n.6, p.533-537, 2011.

KARCZMARCZYK, M.; ABBOTT, Y.; WALSH, C. et al. Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Animals presenting at a University Veterinary Hospital. *App. and Environm. Microbiol.*, v. 77, n. 20, p.7104-7112, 2011.

MEDINA, A.; HORCAJO, P.; JURADO, S. et al. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* strains from ruminants. *J. Vet. Diagn. Invest.* V.23, p. 91-95, 2011.

MENDES C.; OPLUSTIL C.; SAKAGAMI E.; TURNER P.; KIFFER C. Antimicrobial susceptibility in Intensive Care Units: MYSTIC Program Brazil 2002. *Braz. J. Infect. Dis.* v.9(1), p.44-51, 2005.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A. et al. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. 7ed. Washington. D.C. p.325-337, 1999.

OKUBO, T.; SATO, T.; YOKOTA, S. et al. Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Hokkaico, Japan. *Jorn. of Infet. and Chemother.*, v. 20, n. 4, p.243-249, 2014. Disponível em: <<http://www.jiac-j.com/article/S1341-321X%2813%2900064-0/abstract>>. Acessado em: 12 dez. 2014.

OSUGUI, L.; CASTRO, A.F.; IOVINE, R. et al. Virulence genotypes, antibiotic resistance and the phylogenetic backgrounds of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from urinary tract Infections of dogs and cats in Brazil. *Vet. Microbiol.*,v.171, 1-2, p.242-247, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24742952>>. Acessado em: 02 jan. 2015.

PALLO-ZIMMERMAN, L.M.; BYRON, J.K.; GRAVES T.K. Fluoroquinolonas: Then and now. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 32:E1-E8, 2010.

PEDERSEN, K., PEDERSEN, K., JENSEN, H. et al. Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic sample from dogs. *J. Antimicrob. Chemoth.* v.60, p.775-781, 2007.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. UFMG, Belo Horizonte, p.221, 1998.

SCHLUTTER, A.; NORDMANN, P.; BONNIN, R.A. et al. IncH-type plasmid harboring 1 the blaCTX-M-15, blaDHA-1, and qnrB4 genes recovered from animal isolates. *Antimicrob. Agen. Chemother.*, 2014. Disponível em: <<http://www.aac.asm.org/content/58/7/3768.full>>. Acessado em: 27 dez. 2014.

XUE, X. Brief Communication: Detection of Clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from China Containing Transferable Quinolone Resistance Determinants Exhibiting Resistance to Boat Aminoglycose and  $\beta$ -lactams. *Ann. of Clin. & Labor. Scien.*, v.44, n 2, 232-234, 2014.

SANCHEZ, S., STEVENSON, M.A.M., HUDSON, C.R. et al. Characterization of multidrug- resistant *Escherichia coli* isolates associated with nasocomial infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.* 40:3586-3595, 2002.

SILVA, K.C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia da beta-lactamases de espectro estendido no Brasil: Impacto clínico e implicações para o agronegócio. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 48, p. 91-99, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v48n2/a04v48n2.pdf>>. Acessado em: 05 jan. 2015.

WERCKENTHIN, C.; CARDOSO, M.; MARTEL J.L.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in Staphylococci from animal with particular reference to bovine



*Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet. Res.* v.32, p.341-362, 2001.

WITTE, W. Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: Epidemiological aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* v.44 (Suppl.A), p.1-9, 1999.

## CAPÍTULO II

**Pesquisa de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL) em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de animais domésticos atendidos em Hospital Veterinário de Ensino**

Manuscrito submetido à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira (*Brazilian Journal of Veterinary Research*), Seropédica – Rio de Janeiro.

**Pesquisa de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL) em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de animais domésticos atendidos em Hospital Veterinário de Ensino<sup>1</sup>**

M.M.S. Macêdo<sup>2\*</sup>, L. C.A. Silva<sup>1</sup>, R.M. Oliveira<sup>2</sup>, R.A. T. Matos<sup>2</sup>, D. A.N. Pessoa<sup>2</sup>, L. S. A. Silva<sup>3</sup>, F. Garino Junior<sup>3</sup>

**ABSTRACT.-** Macêdo M.M.S, Silva L.C.A, Oliveira R.M., Matos R.A.T., Pessoa D.A.N, Silva L.S.A. & Garino Junior F. 2015. [ **$\beta$ -lactamase research extended spectrum (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates of domestic animals**] Pesquisa de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL) em cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* de isolados de animais domésticos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Microbiologia Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Hospital Veterinário, Av. Universitária, s/n, Patos, PB, 58700-970, Brasil. E-mail:: meiremacedo@yahoo.com.br.

The objective of this study was to determine the presence of ESBL in isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* obtained from pets samples. 100 were selected clinical samples of domestic animals examined at the Veterinary Hospital Health Center and Rural Technology (CSTR) of the Federal University of Campina Grande (UFCG), from various biological materials (anal swabs, nasal, eye and ear, uterine puncture tracheal washings, urine, feces and organs fragments). The bacteria tested for ESBL detection were 60 *E. coli* and 40 *K. pneumoniae*, isolated from March 2013 to March 2014. The tests used were: microbial sensitivity, approach discs and Etest ESBL. The resistance profile across the 100 samples had the highest percentage studied observed resistance to tetracycline with 72% and 63% with aztreonam, followed by cephalosporins 1st, 3rd and 4th generation. In accordance with the results established in this study for detection of ESBL, the 100 samples tested in the approach test discs 71% (100/71) were classified as ESBL-producing and 49% (100/49) in animals company and 25% (100/25) in farm animals. In Etest ESBL 64% (100/64) were classified as ESBL-producing, with 44% (100/44) in companion animals and 20% (100/20) animal production, 11% and 25 to non-producing % not determined (ND). All trunks which have ESBL producers were resistant to more than 4  $\beta$ -lactams tested. The indices found ESBL this study confirm the worldwide concern with this mechanism of resistance. Based on the results, the two tests used to detect ESBL in *E. coli* and *K. pneumoniae* showed similar efficacy. A necessidade do conhecimento do perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos assim como a inclusão do teste de produção de  $\beta$ -lactamase na rotina laboratorial é essencial em medicina humana e veterinária, uma vez que essas enzimas estão presentes em isolados clínicos de humanos e animais, pois a detecção precoce dessa enzima nas bactérias multirresistentes, é de suma importância para se instaurar o tratamento adequado e as medidas necessárias para assim evitar a disseminação destes patógenos em animais e em surtos nosocomiais.

INDEX TERMS:  $\beta$ -lactamase extended spectrum, domestic animals, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.

**RESUMO.-** O objetivo deste estudo foi determinar a presença de ESBL em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* obtidas de amostras de animais domésticos. Foram selecionadas 100 amostras clínicas de animais domésticos atendidos no Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), provenientes de materiais biológicos diversos (swabs anal, nasal, ocular e auricular, punção uterina, lavado traqueal, urina, fezes e fragmentos de órgãos). Foram analisadas 60 *E. coli* e 40 *K. pneumoniae*, isoladas entre março de 2013 e março de 2014. Os testes utilizados foram: difusão em discos, aproximação dos discos e Etest ESBL. Das 100 amostras estudadas o maior percentual de resistência observado para foi para tetraciclina com 72% e aztreonam com 63%, seguido pelas cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração. De acordo com os resultados estabelecidos no presente estudo para detecção de ESBL, das

---

<sup>1</sup> Enviado para publicação em....  
Aceito em.....

<sup>2</sup> Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Hospital Veterinário, Avenida Universitária s/n, Patos- PB.CEP 58700-970. \*Autor para correspondência

<sup>3</sup> Universidade Federal de Campina Grande, Hospital Veterinário, Avenida Universitária s/n, Patos- PB.CEP 58700-970.

100 amostras testadas no teste de aproximação dos discos 71 %, foram classificadas como produtoras de ESBL), sendo 49% em animais de companhia e 25% em animais de produção. No Etest ESBL 64% foram classificadas como produtoras de ESBL, sendo em animais de companhia e 20% em animais de produção, 11% como não produtoras e 25% não determinada (ND). Todas as estipes que foram produtoras de ESBL apresentaram resistência para mais de 4  $\beta$ -lactâmicos testados. Os índices encontrado de ESBL neste estudo confirmam a preocupação mundial com este mecanismo de resistência. Com base nos resultados obtidos, os dois testes utilizados para detecção de ESBL, em *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentaram eficácia semelhantes. A necessidade do conhecimento do perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos assim como a inclusão do teste de produção de  $\beta$ -lactamase na rotina laboratorial é essencial em medicina humana e veterinária, uma vez que essas enzimas estão presentes em isolados clínicos de humanos e animais, pois a detecção precoce dessa enzima nas bactérias multirresistentes, é de suma importância para se instaurar o tratamento adequado e as medidas necessárias para assim evitar a disseminação destes patógenos em animais e em surtos nosocomiais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO:  $\beta$ -lactamase de espectro estendido, animais domésticos, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

## INTRODUÇÃO

Em medicina veterinária os antimicrobianos são utilizados para tratamento de diferentes infecções bacterianas, como aditivos em animais de produção e como uso profilático na prevenção de doenças (Mota et al. 2005). O uso indiscriminado de antibióticos, bem como a associação dessas drogas é apontado como um fator para o aumento da resistência bacteriana. A resistência antimicrobiana na medicina veterinária, tem se tornado um problema crescente, pois tanto os animais de produção como de companhia vêm sendo considerados como reservatórios de bactérias resistentes para vários antimicrobianos, principalmente ao grupo dos  $\beta$ -lactâmicos.

A produção de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL) é reportada como um dos principais mecanismos de resistência em bactérias Gram-negativas, aos  $\beta$ -lactâmicos, principalmente na família de *Enterobacteriaceae*, com maior prevalência para *E. coli* e *Klebsiella* spp (Kotapati 2005). Desde sua descoberta na década de 80, estas enzimas vem mostrando uma grande capacidade de disseminação entre essas duas bactérias (Bush & Fischer 2011).

Segundo Silva & Lincopan (2012), as ESBL em enterobactérias é um problema de saúde pública mundial, apresentando importância tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana. Eles afirmam que mesmo estando disseminada no território brasileiro, não há a notificação de ESBL em todas as unidades federativas. Uma vez que o país não possui um programa nacional de vigilância da resistência microbiana.

Em cães e gatos, a presença de ESBL já foi reportada na Europa, África, Ásia, nas Américas e Oceania (Santos et al. 2013; Nobrega & Brocchi, 2014). Recentemente, Domingos (2010), no estado de São Paulo, verificou que apenas duas cepas de *Escherichia coli*, isoladas de cães apresentaram o fenótipo para ESBL.

No Brasil, Garino Jr. (2004), avaliou fenotipicamente, a presença de ELBL em amostras de *Escherichia coli* isoladas de casos de mastite clínica e subclínica, nos estados de São Paulo e Minas Gerais, pelo método Eteste, onde foi verificada uma alta incidência da enzima. Aizawa et al. (2014), reportou o isolamento de *E. coli*, produtora de ESBL, isoladas de fezes de Bubalinos no estado de São Paulo. A pesquisa de ESBL em medicina veterinária no Brasil ainda é considerada escassa.

O objetivo deste estudo foi detectar a presença de ESBL nas amostras de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* em isolados provenientes de infecções em animais domésticos atendidos em um Hospital Veterinário de ensino, bem como verificar a eficiência dos dois testes fenotípicos utilizados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram isoladas e analisadas 100 cepas de Enterobacteriaceae (60 *E. coli* e 40 *K. pneumoniae*) de infecções de animais domésticos no período de março de 2013 e agosto de 2014. As enterobactérias

foram identificadas através de provas bioquímicas: TSI, Motilidade, Malonato, Produção de Indol, Produção de Urease, Produção de Gelatinase, Produção de fenilalanina desaminase, utilização de Citrato, Reação de Vermelho de Metila (VM) e Voges-Proskauer (VP), fermentação da Lactose, Hidrólise de Esculina e redução de Nitrato, com base em Murray et al. (1999).

Para as três metodologias utilizadas na pesquisa (antibiograma, aproximação em discos e Etest), os inóculos bacterianos foram preparados individualmente em caldo Müeller-Hinton (MH) e a turbidez ajustada a 0,5 da escala de McFarland e para controle de qualidade, foi utilizada *Escherichia coli* ATCC® 25922 (não produtora de ESBL).

Os antibiogramas foram realizados pelo teste de disco difusão em placas de MH, preconizado pela técnica descrita por Bauer et al. (1966), conforme o recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI) (CLSI, 2005), onde após a secagem as placas foram adicionados os seguintes discos de  $\beta$ -lactâmicos: amoxicilina/ácido clavulânico (10  $\mu$ g), ampicilina (30  $\mu$ g), ceftiofor (30  $\mu$ g), cefotaxima (30  $\mu$ g), cefepime (30  $\mu$ g), cefalotina (30  $\mu$ g), cefalexina (30  $\mu$ g), cefoxitina (30  $\mu$ g), ceftazidima (30  $\mu$ g), aztreonam (30  $\mu$ g), Imipinem (30  $\mu$ g) - (Laborclin) em seguida as placas foram incubadas a temperatura de 37°C por 24-48 horas.

Para a realização da detecção de ESBL pelo método de aproximação em discos, os inóculos foram semeados em placas de MH, segundo as normas do CLSI (2008) e após a secagem desses inóculos foram adicionados os discos de: amoxicilina/ácido clavulânico 10  $\mu$ g, aztreonam 30  $\mu$ g, ceftazidima 30  $\mu$ g, cefotaxima 30  $\mu$ g e cefepime 30  $\mu$ g (Laborclin) e incubadas a temperatura de 37°C por 24-48 horas. Foi considerada produtora de ESBL, quando verificados o aumento do diâmetro do halo de inibição de  $\beta$ -lactâmico em direção ao disco de amoxicilina/ácido clavulânico ou o aparecimento da zona fantasma.

Adicionalmente, foi realizado a avaliação de ESBL pelo método fenotípico utilizando a fita de gradiente antimicrobiano Etest de concentrações crescentes de ceftazidima (0,5g/ml a 32g/ml) em uma das extremidade e concentrações crescentes de ceftazidima (0,064g/ml a 4g/ml) associadas a uma concentração fixa (4g/ml) de ácido clavulânico na outra extremidade (Etest® (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Em placas de MH foi semeado individualmente inóculos bacterianos, após a secagem destes inóculos, foi aplicada no centro destas placas uma fita de Etest segundo a recomendação do CLSI (2008) e incubadas a temperatura de 37°C por 16-24 horas. Os resultados foi interpretados conforme instrução do fabricante.

Todos os testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Pós-graduação em Medicina Veterinária do Hospital Veterinário/HV, do Centro de Saúde e Tecnologia Rural/CSTR da Universidade Federal de Campina Grande/UFCCG.

A análise estatística foi do tipo descritiva, calculando-se as frequências absoluta e relativa das amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae* (Sampaio 1998). A comparação entre os testes de aproximação dos discos e Etest para detecção de ESBL nas amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae* em relação aos isolados de animais de companhia e animais de produção foi analisada estatisticamente pelo teste Qui-quadrado (Zar 1999). A realização desses testes se deu mediante auxílio do programa R 3.0.3 com nível de significância  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

O perfil de resistência das 100 amostras avaliadas frente aos 11  $\beta$ -lactâmicos, obteve percentual de resistência observado nas 40 estirpes de *K. pneumoniae* para aztreonam com 75% e 95%, seguido da ceftazidima 60% e 80%, cefipime 65% e 70%, ampicilina 60% e 60%, cefalexina 65% e 60%, cefotaxima 60% e 70%, cefalotina 55% e 70%, cefoxitina 60% e 70%, ceftiofor 55% e 75%, imipenem 35% e 40%, nas amostras de animais de companhia e animais de produção respectivamente (Fig. 1). Já para as 60 estirpes de *E. coli* os índices de resistências apresentados foram, aztreonam com 83% e 67%, seguido da ceftazidima 70% e 60%, cefipime 60% e 60%, ampicilina 70% e 60%, cefalexina 60% e 57%, cefotaxima 57% e 57%, cefalotina 57% e 57%, cefoxitina 64% e 47%, ceftiofor 57% e 47%, imipenem 60% e 47%, nas amostras de animais de companhia e animais de produção respectivamente (Fig. 2).

Em relação à pesquisa de produtoras de ESB, no teste de aproximação dos discos 71% (71/100) foram classificadas como produtoras de ESBL, 62% (44/100) em animais de companhia e 38% (27/100) em animais de produção e apenas 29% foram classificadas como não-produtoras.

No Etest, 64% (64/100) dos isolados foram classificadas como produtoras de ESBL, sendo 44% (44/100) em animais de companhia e 20% (20/100) em animais de produção. Apenas 11% foram não-produtoras e 25% não determinada (ND) (Quadro 1).

Dos isolados em animais de companhia no teste de aproximação dos discos 100% (30/30) e 85% (20/14) foram positivos para ESBL em *E. coli* e *K. pneumoniae* respectivamente. Já nos isolados de animais de produção a detecção ESBL foi de 53,3% (16/30) para *E. coli* e 55% (11/20) para *K. pneumoniae*.

No Etest ESBL observou-se uma detecção de ESBL de 100% (30/30) e 70% (14/20) em isolados de animais de companhia para *E. coli* e *K. pneumoniae* respectivamente, e para os isolados de animais de produção houve uma detecção de ESBL de 46,7% (14/30) e 30% (6/20) para *E. coli* e *K. pneumoniae* respectivamente (Quadro 1).

A ESBL apresentou maior índice de produção nos isolados de animais de companhia do que nos animais de produção ( $p=0,0001$ ). Em relação aos dois testes fenotípicos aplicados, os resultados foram semelhante, não diferindo significativamente ( $p>0,05$ ) (Fig. 2).

Todas as estipes que foram produtoras de ESBL apresentaram resistência para mais de 4  $\beta$ -lactâmicos simultaneamente, principalmente para o aztreonam e ceftazidima.

## DISCUSSÃO

Métodos fenotípicos para a avaliação de resistência aos antimicrobianos em bactérias isoladas de animais domésticos são comumente utilizados na rotina de laboratório. Entretanto, o diagnóstico de enterobactérias produtoras de ESBLs em medicina veterinária ainda é pouco reportado. Com a alta incidência das bactérias *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL descrita em vários países, se torna necessário o monitoramento deste mecanismo de resistência em isolados de animais domésticos. No presente estudo à resistência *in vitro* apresentada frente aos antimicrobianos testados, teve um índice alto observado para o aztreonam, sendo o  $\beta$ -lactâmico com maior resistência, seguido da Ceftazidima e ampicilina. Deve-se ressaltar que as classes de antimicrobianos mais utilizados na rotina veterinária além das penicilinas, incluem as cefalosporinas (IFAH 2002). Este fato provavelmente pode explicar o alto número de amostras resistentes a esta classe em nossa pesquisa.

Os resultados desse estudo são semelhantes aos encontrados por Domingues (2010) em seu trabalho realizado com isolados de *E. coli* em cães, onde apresentou os maiores índices de resistências para ampicilina com 82%.

Entre os isolados analisados para detecção de ESBL, foi observada uma maior incidência da enzima para *E. coli* do para *K. pneumoniae* nos isolados de animais de companhia. Resultados estes que foram maiores do que os encontrados em cães na Itália e Portugal, que detectaram a presença de ESBL de 6,7% e 6,6%, respectivamente (Costa et al. 2004; Caratolli et al. 2005). Já em estudo realizado no Canadá, com 102 cães saudáveis utilizados para visitação, verificou apenas 3% de *E. coli* produtora de ESBL (Lefebvrea et al 2006). Os autores atribuem esta baixa incidência, ao fato desses animais não terem sido expostos a hospitais veterinários e ao uso de antimicrobianos. Contrariamente, em nosso estudo a taxa de incidência de ESBL foi alta tanto em animais de companhia como para animais de produção e, provavelmente a exposição aos fatores de risco como uso indiscriminado de antibióticos, exposição e contato com outros animais doentes em hospital veterinário pode ter contribuído para as taxas observadas.

Garino Jr. (2004), avaliando o fenótipo ESBL em *E. coli* isoladas de mastite bovina, detectou a presença de 50% das amostras positivas para ESBL pelo método Eteste, onde neste estudo ele alertar sobre a múltipla resistência existente e ao risco de disseminação dessas bactérias produtoras de ESBL através do leite e derivados. Em nosso estudo todas as amostras que apresentaram múltipla resistência a mais de quatro  $\beta$ -lactâmicos simultaneamente testados, foram produtoras de ESBL, principalmente ao monobactam (aztreonam) onde foi o antimicrobiano que apresentou maior resistência, seguido das cefalosporinas de 1ª, 3ª e 4ª geração, e das penicilinas (ampicilina). Fato este, que pode esta, correlacionado com uma disseminação através de alimentos de origem animal, como leite e seus derivados, bem como de produtos cárneos. Porém os estudos realizados na medicina veterinária ainda não se faz esta correlação de disseminação entre as espécies humanas e animais. Para tanto são necessários mais estudos para verificar esta relação entre espécies.

A ocorrência de ESBL em amostras isoladas de animais de companhia sinaliza para a necessidade de um melhor controle na utilização de antimicrobianos, pois esses animais estão em contato próximo diariamente com seus proprietários, podendo possibilitar a transmissão cruzada de bactérias multirresistentes. Outro fator de importância, é a possibilidade de transferência de genes de resistência para as bactérias da microbiota normal do novo hospedeiro, seja do animal para o homem ou vice-versa.

Como esperado, a espécie *E. coli* foi a principal produtora de ESBL entre as duas enterobactérias avaliadas, representando uma média total de 75% e *K. pneumoniae* com 60% em relação aos dois testes utilizados. A *K. pneumoniae* nas amostras isoladas de animais de companhia (cães e gatos) foram mais produtoras de ESBL comparada com as amostras isoladas de animais de produção (bovinos, equinos, caprino, ovinos e suínos) em ambos os testes. Um número considerável de amostras de *Klebsiella* spp. multirresistentes, apresentando um genótipo confirmatório para ESBL, em amostras de cães e gatos necropsiados que foram a óbito por infecções desconhecidas também foi relatado em estudo realizado por Donati et al. (2014).

A detecção de ESBL no Brasil em enterobactérias já é considerada alarmante, pois genes variantes foram descritos nos últimos anos, tanto em animais como em humanos, principalmente em pacientes com infecções hospitalares (Nogueira et al. 2013, Queiroz et al. 2012).

Okubo et al. (2014) em seu estudo, afirma que a presença da ESBL em infecções tanto em animais como em humanos, esta proporcionando um crescente aumento da resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e se tornando um problema mundial de saúde. Este é um fato preocupante, principalmente quando se baseia nos estudos com animais de companhia que esta diariamente em contato com seus donos. Visto que nesta pesquisa os maiores índices de produção de ESBL foram das bactérias isoladas de cães e gatos, e este aumento da resistência antimicrobiana entre várias espécies pode esta realmente acontecendo.

O teste de aproximação dos discos utilizando cefotaxima, cefpodoxima, cefipime, aztreonam e amoxicilina/ácido clavulânico, apresentou excelente desempenho com 74% de detecção de ESBL nos isolados de *E. coli* e 64% nos isolados de *K. pneumoniae*. É importante ressaltar que as amostras não detectadas ESBL pelo teste de aproximação dos discos, no Etest foram às mesmas que tiveram resultados ND. Isto pode sugerir a presença de inibidor resistente TEM (IRT) ou AmpC. As cepas com resultados ND devem ser investigadas para outros mecanismos de resistência com o método de referência do (CLSI, 2008).

Pereira et al. (2003) avaliando a acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora ESBL, obtidas de isolados em hemocultura de pacientes internados no Hospital São Paulo utilizou o teste de adição de ácido clavulânico comercializados pela Oxoid® (Basingstoke, Inglaterra) e do Etest ESBL, onde o primeiro teste citado apresentou excelente desempenho e pode ser facilmente implementado na rotina laboratorial por ser de alta acurácia e de fácil realização. Assim como o teste de aproximação dos discos utilizado neste estudo se mostrou eficaz na detecção de ESBL, é importante levar em consideração para sua utilização na rotina laboratorial, por sua eficiência e seu baixo custo.

Ambos os testes avaliados (aproximação dos discos 71% e Etest ESBL 64%) apresentaram resultados confiáveis. Das 100 bactérias testadas, o teste de aproximação dos discos apresentou uma maior detecção, comparado com o Etest, porém, não diferindo significativamente com o valor de  $p > 0,05$ .

A alta detecção de ESBLs encontrada demonstra a importância de realizar a pesquisa fenotipicamente dessas enzimas na rotina laboratorial, não só nas espécies de *E. coli* e *K. pneumoniae*, mas em todas as bactérias Gram-negativas causadoras de infecções. Porém, estudos moleculares são necessários para identificação dos genes das ESBLs detectadas para poder comparar com os tipos mais prevalentes relatados no Brasil, tanto em humanos como em animais e assim poder iniciar um perfil epidemiológico dessas infecções bacterianas na região estudada. Pois estudo realizado por Domingos (2010) no Brasil, em 158 amostras de *E. coli* isoladas de infecções em cães, verificou que apenas dois isolados apresentaram o fenótipo para ESBL. Entretanto, nos testes genotípicos foram verificados a presença de genes de ESBL blaTEM, (98,5%), ampC (95,5%), blaCTX-M (35,8%), blaSHV (6%) e cmY (2,9%). O que ressalta a necessidade de estudos sobre a epidemiologia molecular em enterobactérias isoladas de animais.

Com base nos resultados obtidos, os dois testes utilizados para detecção de ESBL, mostraram que as amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentaram a presença da enzima, apresentando ambos os testes uma eficácia semelhante. A necessidade do conhecimento do perfil de resistência múltipla frente aos  $\beta$ -lactâmicos assim como a inclusão do teste de produção de  $\beta$ -lactamases na rotina de laboratório é essencial em medicina veterinária, uma vez que essas

enzimas estão presentes em isolados clínicos de humanos e animais, e sua detecção precoce é de suma importância para se instaurar o tratamento adequado e as medidas necessárias para assim evitar a disseminação destes patógenos em animais e em surtos nosocomiais.

**Agradecimentos.**- Ao professor Dr. Felício Garino Junior, pela orientação. À Universidade Federal de Campina Grande. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado, e ao INCT (CNPq).

## REFERÊNCIAS

- Aizawa J. Neuwirt N., Barbato L., Neves P. R., Leigue L., Padilha J., Castro A.F.P., Gregory L. & Lincopan N. Identification of fluoroquinolone-resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (CTX-M-8)-producing *Escherichia coli* ST224, ST2179 and ST2308 in buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Antimicrob. Chemother.* (2014) 69 (10): 2866-2869.
- Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C. & Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45(4):493-496.
- Bush K. & Fisher J. F. 2011. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new  $\beta$ -lactamases from Gram-negative bacteria. *Annu. Ver. Microbiol.*, 65: 455-478.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fiftenth Informational Supplement. CLSI document M 100-S 15 (ISBN 1-56238-556-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road. Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3rd ed. Approved standard M31-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Carattoli A., Lovari, S., Franco A., Cordaro G., Di Matteo P. & Battisti A. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:833-835.
- Costa D., Poeta P., Brinas L., Saentz Y. & Rodrigues J. Torres, C. 2004. Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *J. Atimicrob. Chem.* 54:960-961.
- Domingos, D.F. 2010. Determinação e identificação de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL) em cepas de *Escherichia coli* isoladas de cães. Dissertação de Mestrado na área de microbiologia no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas-SP, 61-63p. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000770106>>. Acessado em: 24 nov. 2014.
- Donati V. Feltrin F. Hendriksen R.S. Svendsen C.A., Cordaro G., García-Fernández A., Lorenzetti S., Lorenzetti R., Battisti A.\* & Franco A. 2014. Extended-Spectrum-Beta-Lactamases, AmpC Beta-Lactamases and plasmid Mediated Quinolones Resistance in *Klebsiella* spp. from Companion Animals in Italy. *Plos One.* 9(3): 90564. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3942433/>>. Acessado em: 28 nov. 2014.
- Dropa, M., Balsalobre, L.C., Lincopan, N., Mamizuka, E.M., Murakami, T., Cassettari, V.C., Franco, F., Guida, S.M., Balabakis, A.J., Passadore, L.F., Santos, S.R., Matté, G.R. & Matté, M.H. 2009. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae isolated in a public hospital in Brazil. *Ver. Inst. Med. Trop. SP.* 51(4):203-209.
- Ferreira J.C. Penha Filho R. A., Andrade L.N., Berchieri Jr. & Darine A.I. 2014. Detection of chromosomal blaCTX-M-2 in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens. *Clinical Microbiology Infection.* In press.
- Freitas A.L.P., Machado D.P., Soares F.S.C. & Barth A.L. 2003. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella* spp and *Escherichia coli* Obtained in a Brazilian Teaching Hospital: Detection, Prevalence and Molecular Typing. *Brazilian Journal of Microbiology* 34: 344-348.
- Garino Jr. F. 2004. Avaliação da sensibilidade "in vivo" de sorogrupos de *Escherichia coli* de casos de mastite bovina e pesquisa da produção de betalactamases e detecção de múltipla resistência - Tese de doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas - USP, 53-97p.
- IFAH - International Federation For Animal Health. Annual Report. 2002. [Homepage na Internet] 2003. Disponível em: <[http://www.ifahsec.org/international/annual\\_report/IFAHnnRep2002.pdf](http://www.ifahsec.org/international/annual_report/IFAHnnRep2002.pdf)>. Acesso em 2 nov 2014.



- Kotapati S., Kuti J. L., Nightingale C H. & Nicolau D. P. Clinical implications of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Klebsiella* species and *Escherichia coli* on cefepime effectiveness. *Journal of Infection*, 51, 211–217, 2005. doi:10.1016/j.jinf.2005.01.005.
- Lefebvre S. L., Waltner-Toews D., Peregrine A.S., Reid-Smith R., Hodge L., Arroyo L.G. & Weese J.S. 2006: Prevalence of zoonotic agents in dogs visiting hospitalized people in Ontario: implications for infection control. *J. Hosp. Infect.* 62, 458–466.
- Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, Perilli M, Stefani S, Amicosante G., Rossoline G.M. & Toniolo A. 2006. Trends in Production of Extended-Spectrum-Lactamases among Enterobacteria of Medical Interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey. *J. Clin Microbiol* 44:1659-1664. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672390>>. Acessado em: 02/01/2015.
- Mota R. A, Silva K. P. C., Freitas M. F. L., Porto W. J. N. & Silva L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz J vet Res anim Sci*, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.
- Minarini, L.A.R., Gales, A.C., Palazzo, I.C.V. & Darini, A.L.C. 2007. Prevalence of Community-Occurring Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Brazil. *Curr Microbiol.* 54: 335-341.
- Murray P.R., Baron E.J. & Pfaller, M.A. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. 7ed. Washington. D.C. 325-337p.
- Nóbrega D.B. & Brocchi M. 2014. An overview of extended-spectrum beta-lactamases in veterinary medicine and their public health consequences. *J. Infect. Dev. Ctries.*, 8(8):954-960.
- Nogueira K.S., Paganini M.C., Conte A, Cogo L.L., Reason T.M., Silva M.J. & Dalla-Costa L.M. 2014. Emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter* spp. In patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. *Enferm. Infecç. Microbiol. Clin.* 32(2) 87-92. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23587705>>. Acessado em: 05/02/2015.
- Okubo T. Sato T. Yokota S., Usui M. & Tamura Y. 2014. Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan. *Jorn. of Infection and Chemotherapy*, 20(4): 243-249. Disponível em: <<http://www.jiac-j.com/article/S1341-321X%2813%2900064-0/abstract>>. Acessado em: 12 dez. 2014.
- Queiroz M.L. Antunes P., Mourão J., Merquior V.L., Machado E. & Peixe L.V. 2012. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases antimicrobial resistance genes, and plasmid content in *Escherichia coli* isolates from different sources in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 74(1): 91-94. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22749240>>. Acessado em: 28/12/2014.
- Villegas M.V., Kattan J.N., Quinteros M.G. & Casellas J.M. 2008. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect.* 14(Suppl. 1): 154-158.
- Pereira A.S, Carmo Filho J.R., Tognim M.C.B. & Sader, H.S. 2003. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. Rio de Janeiro, 39(4).
- Reis A.O., Gales, A.C. & Sader, H.S. 1998. Avaliação da acurácia do teste de adição clavulanato em disco para a detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL. *J. Bras. Patol.* 34: 85-93.
- Santos L., Moura R.A., Ramires P.A., Pestana de Castro, A. & Lincopan, N. 2013. Current status of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in animals. In: Méndez-Vilas, A., editor. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*. Formatex Research Center, Badajoz.
- Silva K.C. & Lincopan, N. 2012. Epidemiologia das beta-lactamases de espectro estendido no Brasil: Impacto clínico e implicações para o agronegócio. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 48:91-99.
- Souza R.R. & Pitondo-Silva A. 2008. Multilocus Sequence Typing para identificação de linhagens atípicas de *Yersinia*. In: Congresso Brasileiro de Genética, 54, 2008, Salvador, Bahia **Anais...** Salvador, Bahia.
- ZAR, J. H. *Biostatistical Analysis*. 4a ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 929p.

## Legendas das Figuras

**Figura 1:** Análise quantitativa do perfil de resistência das 60 estirpes de *Escherichia coli* isoladas de animais de produção e animais de companhia.

**Figura 1:** Análise quantitativa do perfil de resistência das 40 estirpes de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de animais de produção e animais de companhia.

Figura 1

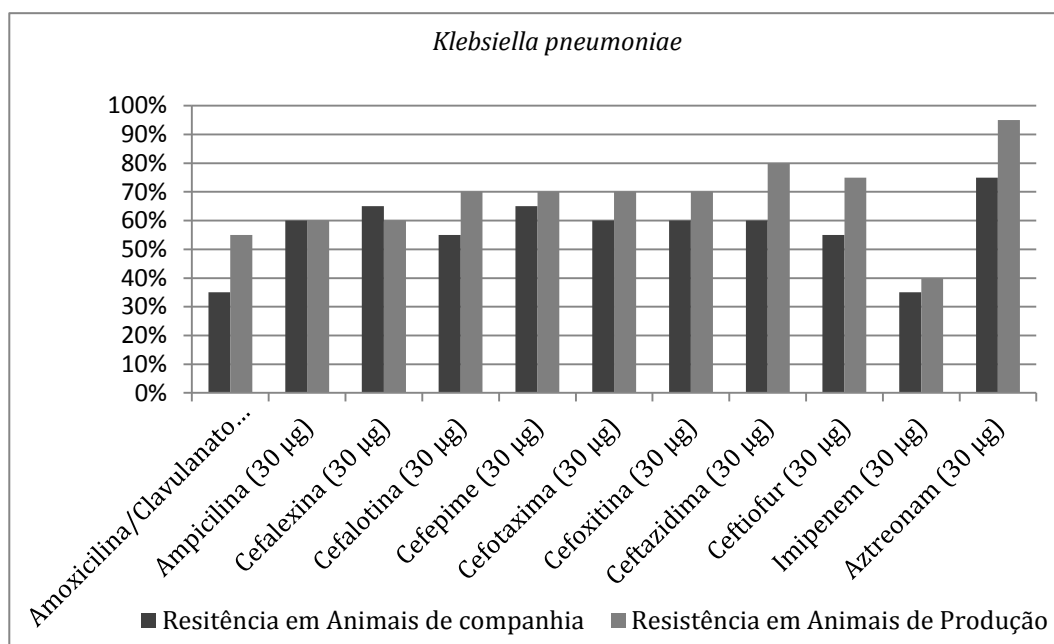
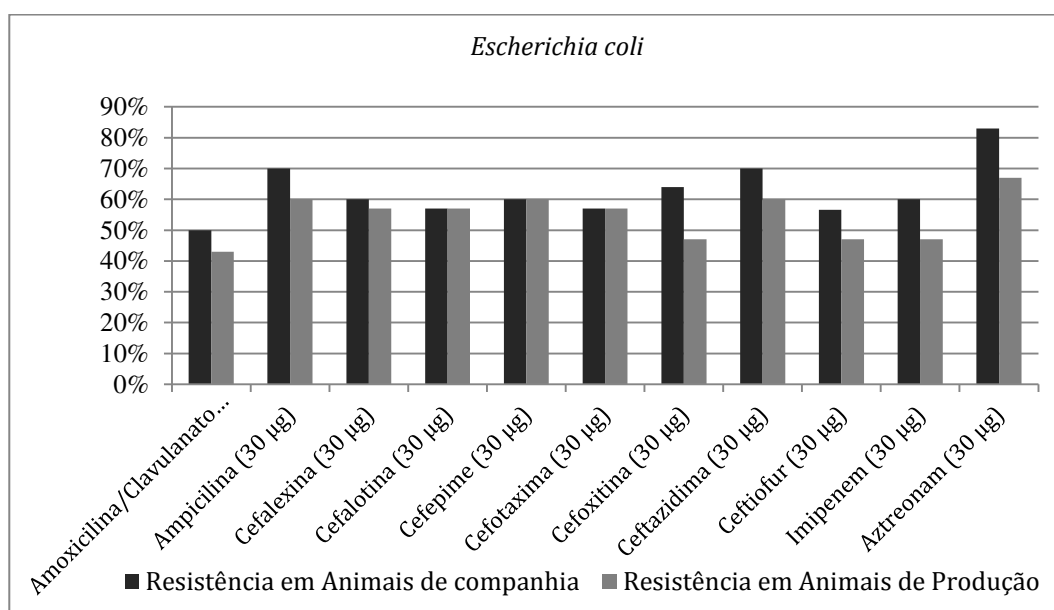


Figura 2



## O Quadro

**Quadro 1:** Resultado da produção de ESBL em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* em animais de companhia e animais de produção, mediante a utilização dos testes de Disco aproximação e Etest para ESBL.

Cepas	Aproximação dos discos positivo para ESBL						Fita Etest positivo para ESBL					
	Animais de companhia			Animais de produção			Animais de companhia			Animais de produção		
	FA	P	FR	FA	P	FR	FA	P	FR	FA	P	FR
<i>Escherichia. coli</i> (n = 60)	30	30	100%	30	16	53,3%	30	30	100%	30	14	46,7%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 40)	20	14	85%	20	11	55%	20	14	70%	20	6	30%
Total (n = 100)	44			27			44			20		
Total de positivas por testes				71						64		

FR = Frequência relativa  
P = Positivo  
FA = Frequência absoluta

## CONCLUSÕES GERAIS

- O monitoramento constante da utilização de antimicrobiano eficaz para cada enfermidade e o seu uso adequado é uma forma de reduzir o alto índice de resistência bacteriana em animais domésticos.
- A utilização do antibiograma na rotina laboratorial juntamente com um teste de detecção de ESBL eficiente com baixo custo é de fundamental importância para acompanhar e estabelecer métodos de controle para a redução dessas bactérias multirresistentes e produtoras de ESBL.
- Em bactérias produtoras de ESBL é importante realizar a identificação dos genes através de testes moleculares, para poder traçar um perfil epidemiológico das infecções bacterianas de cada região estudada.