

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO MEIO AMBIENTE

**ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E DETERMINAÇÃO
DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS EM ISOLADOS DE *Escherichia coli* DE
ORIGEM AMBIENTAL, HUMANA E ANIMAL**

Ana Paula Winter Pastore

Bacharel em Biomedicina - IPA

Agosto, 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO MEIO AMBIENTE

**ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E DETERMINAÇÃO
DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS EM ISOLADOS DE *Escherichia coli* DE
ORIGEM AMBIENTAL, HUMANA E ANIMAL**

Ana Paula Winter Pastore
Bacharel em Biomedicina – IPA

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do Grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, RS, Brasil
Agosto, 2014.

CIP - Catalogação na Publicação

Winter Pastore, Ana Paula

ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E
DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS EM ISOLADOS DE
Escherichia coli DE ORIGEM AMBIENTAL, HUMANA E
ANIMAL / Ana Paula Winter Pastore. -- 2014.
76 f.

Orientadora: Gertrudes Corção .
Coorientadora: Marisa Da Costa.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Escherichia coli . 2. RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS . 3. GRUPOS FILOGENÉTICOS . I. Corção
, Gertrudes, orient. II. Da Costa, Marisa, coorient.
III. Título.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Gertrudes Corção e à Dra. Marisa da Costa pela orientação, dedicação, paciência, ideias e oportunidades oferecidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do PPGMAA que contribuíram de alguma forma para a minha formação.

As amigas do laboratório 166 Natália Canal, Letícia Otton, Marina Bastos, Belize Leite, Karine Lena Meneghetti, Clara Ponzi, Marina Campos, Juliano Dellazen, Waleska Sartori e ao amigo Rodrigo Linhares pela disposição em ajudar no que fosse necessário.

A minha querida família, meus pais (Ulisses e Maria Elisabet), minha irmã (Raquel) e minhas tias (Ana, Solange e Beatriz) pelo carinho, apoio, incentivo, amor e por acreditarem sempre em mim.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Análise da resistência a antimicrobianos e determinação dos grupos filogenéticos em isolados de *Escherichia coli* de origem ambiental, humana e animal

Resumo

Autor: Ana Paula Winter Pastore
Orientadora: Profa Gertrudes Corção
Co-orientadora: Profa Marisa da Costa

Por sua ubiquidade na matéria fecal, a *Escherichia coli* é amplamente utilizada como um indicador sanitário, entretanto, a *E.coli* pode apresentar a capacidade de persistir e se multiplicar em ambientes distintos, fora de seu hábitat primário. A determinação filogenética é ferramenta auxiliar na melhor caracterização destas cepas cosmopolitas. Membros da microbiota comensal, como a *E. coli*, sofrem pressão seletiva pela exposição a antimicrobianos, resultando no aumento da resistência nestas populações. Pela importância da utilização da *E. coli* como um indicador sanitário, somada a disseminação de cepas resistentes desta espécie nos diversos ambientes, este estudo visou realizar a determinação filogenética de isolados de *E.coli* multirresistentes provenientes de amostras ambientais, animais e humanas. A susceptibilidade foi avaliada frente a 15 antimicrobianos, em 157 isolados de *E. coli* (32 de humanos, 44 de suínos, 34 de aves e 47 do ambiente). A resistência foi maior a ampicilina e tetraciclina (96%), ao sulfametoxazol – trimetoprim (70%) e ao clorafenicol (67,5%), entre todos os isolados. Os isolados de origem animal e humana foram os mais associados a um perfil de multirresistência mais amplo e a produção de ESBL. Na determinação filogenética, baseada no método de Clermont et. al. (2000), os filogrupos B1 (49%) e A (34%) foram os mais prevalentes, tendo D (11%) e B2 (6%) menor representatividade. Os filogrupos A e B1 também foram os mais relacionados a multirresistência. Os resultados indicaram que os isolados deste estudo são associados a microbiota comensal de humanos e animais e que estas populações sofreram exposição a antimicrobianos de amplo espectro. Tal fato pode implicar em alterações destas comunidades microbianas, possibilitando a disseminação de microrganismos potencialmente virulentos em hábitats secundários.

1 Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (76) Agosto, 2014.

Analysis of Antimicrobial Resistance and Identification of Phylogenetic Groups in *Escherichia coli* Isolates of Environmental, Human and Animal Origin

Abstract

Author: Ana Paula Winter Pastore

Adviser: Dr. Gertrudes Corção

Co-adviser: Dr Marisa da Costa

Due to its ubiquity in fecal matter, *Escherichia coli* is widely used as a microbiological indicator of fecal contamination. However, *E. coli* may develop the capacity to persist and multiply in distinct environments, outside of its primary habitat. Phylogenetic identification is an auxiliary tool in the characterization of these cosmopolitan strains. Members of the commensal microbiota, like *E. coli* suffer selective pressure from exposition to antimicrobials, resulting in resistance increases in these populations. Due to the importance of *E. coli* as a bioindicator of fecal contamination and to the dissemination of resistant strains of this species in the environment, this work aimed to identify phylogenetic groups in multiresistant isolates of *E. coli*, from environmental, animal and human samples. The susceptibility was assessed against 15 antimicrobials, in 157 isolates of *E. coli* (32 from humans, 44 from swines, 34 from birds and 47 from the environment). The resistance was higher to ampicillin and tetracycline (96%), sulfamethoxazole - trimethoprim (70%) and chloramphenicol (67.5%). Isolates of animal and human origin were associated to a wider multiresistance profile and higher ESBLs production. In the phylogenetic identification, based on the method proposed by Clermont et al. (2000), phylogroups B1 (49%) and A (34%) were the majority, while D (11%) and B2 (6%) had less representation. Phylogroups A and B1 had also more significant relation to multiresistance. Results indicated that the isolates in this study were associated to the commensal microbiota of humans and animals and that these populations were exposed to broad-spectrum antimicrobials. This can cause changes in these microbial communities, which may result in the dissemination of potentially virulent organisms in secondary habitats.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1	<i>Escherichia coli</i>	5
2.2	<i>E. coli</i> em habitats secundários.....	8
2.3	Grupos Filogenéticos de <i>E. coli</i>	10
2.4	Antimicrobianos e Multirresistência.....	14
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1	Amostras.....	20
3.1.1	Coleta e processamento.....	20
3.1.2	Recuperação e manutenção dos isolados.....	22
3.2	Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.....	22
3.3	Extração de DNA.....	24
3.4	Identificação de filogrupos de <i>E. coli</i>	24
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1	Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.....	27
4.2	Determinação filogenética e incidência.....	34
4.3	Filogrupos de <i>E. coli</i> e multirresistência a antimicrobianos.....	39
4.4	Distribuição filogenética e produção de ESBLs.....	46
5.	CONCLUSÕES.....	53
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
8.	APÊNDICES.....	66

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1 - Antimicrobianos utilizados para a avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de <i>E. coli</i>	22
TABELA 2 - Oligos utilizados, respectivas sequências e tamanho dos amplicons obtidos, para determinação dos filogrupos dos isolados de <i>E. coli</i>	25
TABELA 3 - Perfil de susceptibilidade dos isolados de <i>E. coli</i> multirresistentes a antimicrobianos.....	28
TABELA 4 - Distribuição em filogrupos dos isolados multirresistentes de <i>E. coli</i>	35
TABELA 5 - Perfil de multirresistência a antimicrobianos e distribuição filogenética dos isolados de <i>E. coli</i>	39
TABELA 6 - Distribuição em filogrupos dos isolados de <i>E. coli</i> fenotipicamente positivos para ESBLs.....	47

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1: Árvore dicotômica para determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli*, criada com base nos resultados das amplificações por PCR dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TspE4.C2.....12

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	porcentual
°	Grau
°C	Graus Celsius
AMC	Amoxicilina-ácido clavulânico
AMI	Amicina
AMP	Ampicilina
ATM	Aztreonam
BHI	Caldo infusão cérebro coração
CAZ	Ceftazidima
CFO	Cefoxitina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CPM	Cefepime
CTX	cefotaxima
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxiribonucleotideo triosfosfato
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
EMB	Ágar Eosina Azul de Metileno
ESBL	β-lactamase-espectro-estendido
et al	e colaboradores
g	grama
GEN	Gentamicina
H ₂ S	sulfeto de hidrogênio
IPM	Imipinem
Kb	kilobase
Km	quilômetro
M	Molar
mg	miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	militro
mM	milimolar
ng	nanograma

NaCl	Cloreto de sódio
NOR	Norfloxacina
pH	logaritmo decimal do inverso da atividade de íons de hidrogênio numa solução.
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPT	Piperacilina-tazobactam
SUT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TET	Tetraciclina
TSI	Ágar Ferro Tríplice Açúcar
TSA	Ágar Triptona de Soja
TSB	Caldo Triptona de Soja
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	unidade
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrometro
µM	micromolar
v	volt

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A *Escherichia coli* tem como hábitat primário o trato intestinal de animais de sangue quente, sendo um microrganismo singular da microbiota gastrointestinal destes animais, auxiliando seus hospedeiros na quebra de vários compostos. Mesmo fazendo parte da microbiota normal do intestino de vertebrados, numa relação de comensalismo, algumas cepas de *E. coli* podem provocar uma grande variedade de doenças, tais como diarreia, infecções do trato urinário e infecções nosocomiais.

Os membros desta espécie podem ser classificados sorologicamente em sorogrupos e sorotipos, com base na sua composição antigênica, pois cada variante pode expressar diferentes antígenos em sua superfície. Os antígenos analisados para tanto são: O (antígeno do lipopolissacarídeo - LPS); H (antígeno flagelar) e K (antígeno capsular). O antígeno O possibilita classificar a *E. coli* em sorogrupos, sendo que, mais de 170 sorogrupos já foram identificados atualmente. Da combinação da identificação do antígeno O com a identificação do antígeno H e, em alguns casos, o antígeno K, se torna possível definir os sorotipos. Tal classificação é relevante, porque é sabido que cada sorogrupo e sorotipo possui características individuais quanto à resposta contra antimicrobianos e / ou com relação a sua patogenicidade.

Diversos fatores de virulência, compartilhados por muitas espécies de *Escherichia*, são, também, associados a patogenicidade oportunista das mesmas. Estes fatores incluem: a capacidade de produzir bacteriocinas, fímbrias, adesinas, sideróforos e uma cápsula com ação antifagocítica. Além da classificação antigênica das cepas de *E. coli*, estas podem ser agrupadas quanto aos fatores de virulência que apresentam, sendo divididas em patótipos, os quais podem causar infecções intestinais e extra-intestinais em uma gama ampla de hospedeiros, incluindo os seres humanos.

O surgimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos e as próprias drogas, em quantidades variáveis, tanto na clínica médica e veterinária, como em ambientes relacionados à pecuária e avicultura e no próprio meio ambiente, resulta da crescente utilização, muitas vezes sem o devido controle, de antimicrobianos na medicina humana e veterinária. A exposição contínua a antimicrobianos cria uma pressão seletiva imposta aos membros da microbiota comensal de animais e humanos, levando a alterações nos padrões de resistência destes microrganismos, os quais refletem esta exposição prévia. Tais alterações podem transformar estes microrganismos em potenciais reservatório de genes de resistência, facilitando a propagação dos mesmos. O aumento da capacidade de resistência a antimicrobianos, se torna, cada vez, um problema de saúde pública emergente e disseminado em todo o mundo.

Devido à sua ubiquidade na matéria fecal, a *E. coli* é amplamente utilizada como um indicador sanitário para a avaliação da qualidade da água e de alimentos, agindo como um indicador chave de contaminação fecal e da

presença de agentes patogênicos de origem intestinal. De forma ideal, o microrganismo indicador sanitário precisa apresentar especificidade quanto ao seu hábitat, ocorrendo apenas em ambientes intestinais, estar presente em altas concentrações nas fezes, para possibilitar sua detecção, mesmo quando em grandes diluições, e apresentar certa resistência aos ambientes extra-intéricos, tendo assim, um período mínimo de sobrevivência que possibilite as análises.

O ciclo de bactérias entéricas, como a *E. coli*, pode envolver a transição entre distintos ambientes. Enquanto certas espécies se restringem a um único hábitat, outras são cosmopolitas, tendo a capacidade de residir em uma variedade de habitats como solo, vegetação e águas superficiais. Cada vez mais as características que fazem da *E. coli* um dos melhores indicadores de contaminação fecal têm sido questionadas, pois estudos têm demonstrado que algumas cepas de *E. coli* possuem a capacidade de persistir e se multiplicar em ambientes externos ao corpo do hospedeiro, ou seja, em habitats secundários, mesmo que na ausência de contaminação fecal e, somado a isso, estes microrganismos podem levar consigo fatores genéticos relacionados a multirresistência a antimicrobianos. Estes resultados indicam que características genotípicas e fenotípicas singulares podem estar relacionadas à resistência e ao desenvolvimento destas cepas em habitats secundários. Através da determinação do grupo filogenético, muito pode ser aprendido a respeito das características de cepas desconhecidas de *E. coli*.

Tendo em vista a importância, em termos de saúde pública, da utilização da *E. coli* como um indicador sanitário, somada a emergência de

microrganismos desta espécie, multirresistentes a antimicrobianos, e com capacidade de persistir e se multiplicar fora do hábitat primário costumeiro, este estudo visou realizar a determinação filogenética de isolados de *E. coli* multirresistentes provenientes de amostras ambientais, animais e humanas, de acordo com o estabelecido no trabalho de Clermont *et al.* (2000). Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1) Isolar e identificar *E. coli* provenientes de amostras ambientais, animais (aves e suínos) e de origem humana.

2) Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos destes isolados e pesquisar produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs).

3) Analisar a frequência dos filogrupos entre os isolados de *E. coli*, de diferentes origens, e relacionar os grupos filogenéticos com a resistência a antimicrobianos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

Os membros do gênero *Escherichia* pertencem à família *Enterobacteriaceae* e são habitantes universais do trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente, podendo estar envolvidos em vias metabólicas no trato gastrointestinal dos mesmos, tendo papel na síntese de vitaminas e na manutenção do ambiente anaeróbio, através do consumo do oxigênio, sendo, também, amplamente distribuídos no solo, água e vegetação. O gênero *Escherichia* abrange as espécies *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* e *E. vulneris*, contudo, em virtude de sua importância clínica e ambiental, a espécie *E. coli* é a mais estudada. (Welch et al., 2006).

A espécie *E. coli* e apresenta as seguintes características fenotípicas: bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, oxidase negativa, catalase positiva, fermentador de lactose, sacarose e glicose (com produção de gás), podendo ou não apresentar motilidade e sendo incapaz de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono, em virtude da ausência da enzima citrato permease (Welch et al., 2006). As exigências relacionadas a qualquer fator de crescimento são raras, tendo a capacidade de crescer a partir de uma variedade de fontes de carbono e em temperaturas que variam de 5°C

a 45°C, sendo a temperatura ideal de crescimento de 37°C. São microrganismos resistentes ao calor, sobrevivendo a 60°C por 15 min ou 55°C por 60 min, tolerando uma variação de pH na faixa 4,4 a 6,0 (Altwegg & Bockmuhl, 1998). Esta espécie pode ainda ser caracterizada conforme o sorotipo e sorogrupo, de acordo com a caracterização dos antígenos somáticos “O” e dos antígenos flagelares “H”.

Entre os microrganismos desta espécie, podem ser encontradas várias cepas de *E. coli* patogênicas ao homem, a outros animais e à plantas. Algumas cepas são conhecidas por possuírem a capacidade de causar doenças e, em determinados casos, até levar os acometidos a óbito. As patologias associadas à *E.coli*, como gastroenterites e outras doenças extraintestinais (cistite, septicemia e até meningite), estão correlacionadas com a presença de genes responsáveis pela codificação de características que conferem virulência ao microrganismo (Yingst et al., 2006). Entretanto, a presença e manutenção dos fatores de virulência torna-se contraditória diante do princípio de que estas características proporcionariam poucas vantagens seletivas ao microrganismo. Tal fato sugere que a maioria dos fatores de virulência podem ser necessários para a colonização de novos nichos ecológicos, não relacionando-se, obrigatoriamente, à patologias ou à disseminação para novos hospedeiros (Le Gall et al., 2007).

As cepas de *E. coli* podem ser classificadas como: (i) comensais, (ii) patogênicas intestinais (entérica / causadoras de gastroenterite), ou (iii) *E. coli* patogênica extraintestinais (ExPEC). *E. coli* responsáveis por causarem infecções intestinais incluem *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterro-

hemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) *E. coli* aderente difusamente (DAEC) (Hamelin et al., 2007). O ciclo de vida de bactérias entéricas, tais como *E. coli*, envolve a transição entre ambientes distintos. Algumas espécies se restringem a um único habitat, enquanto outras são cosmopolitas e residem em uma variedade de habitats como o aquático (tanto nas camadas superficiais, como nas mais profundas) e o terrestre. O trato gastrointestinal de animais e humanos é tido como habitat primário, já as enterobactérias encontradas em água, solo e sedimentos estariam em um habitat secundário (Gordon, 2001; Leclerc et al., 2001).

A *E. coli* é ainda um importante microrganismo indicador da contaminação fecal em ambientes aquáticos. Em muitos casos, um aumento na quantidade de isolados de *E. coli* em uma amostra é relacionado a um risco aumentado de doenças gastrointestinais causadas por outros microrganismos entéricos patogênicos como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Campylobacter jejuni* (Savichtcheva & Okabe, 2006). Há, no entanto, algumas evidências de que este indicador fecal pode se originar de outras fontes não entéricas, sobrevivendo por um tempo significativo em águas tropicais ou temperadas, tornando-se até parte integrante da comunidade microbiana aquática. Em sendo assim, a determinação da origem da contaminação fecal, em ambientes aquáticos, é essencial para estimar os riscos reais à saúde associados com a poluição e para desenvolver estratégias que controlem a poluição dos recursos hídricos (Blanch et al., 2006; Kaneene et al., 2007).

2.2 *E. coli* em habitats secundários

A presença de *E. coli* em habitats secundários, como lagos e corpos de água, na ausência de contaminação fecal, indica que, pelo menos, algumas cepas de *E. coli* têm a capacidade de se replicar em ambientes externos, fora do trato gastrointestinal que é seu habitat primário (Power et al., 2005). Estudos realizados em regiões tropicais e temperadas, sugerem que a *E. coli*, em condições favoráveis, é capaz de replicar-se e atingir alta densidade populacional, mesmo fora de um hospedeiro (Desmarais et al., 2002; Ishii et al., 2006). O papel destes ambientes secundários tem sido revisto e os resultados demonstram que estes nichos podem suportar o crescimento de algumas cepas específicas de *E. coli* (aquelas capazes de saprofitismo), dependendo da temperatura e da disponibilidade de nutrientes no meio (Solo-Gabriele et al., 2000).

Em um estudo desenvolvido na Austrália, cepas encapsuladas de *E. coli*, oriundas de eventos de floração bacteriana, foram isoladas a partir de dois lagos, na ausência de contaminação fecal, apresentando, aparentemente, um modo de vida livre. Tais resultados sugerem que algumas cepas de *E. coli* têm evoluído para um estilo de vida livre, não exigindo uma população de acolhimento para seu crescimento e multiplicação, e que, a presença de uma cápsula pode melhorar significativamente a sobrevivência destes microrganismos, sendo um fator relevante para o êxito desta mudança de habitat (Power et al., 2005). A existência e persistência de cepas “ambientais” de *E. coli* têm sido relacionadas com a capacidade destes microrganismos de

crescer de forma eficiente em condições oligotróficas, tendo este fato também uma relação com um sistema de aquisição de ferro aprimorado (Van Elsas et al.; 2010).

A hipótese mais provável é a de que, uma vez liberada na água, a população de *E. coli* originada da microbiota humana e de animais (hábitat primário) sofra uma pressão seletiva do meio ambiente, como privação de nutrientes, a baixa temperatura, salinidade, a exposição à radiação solar e a competição com comunidades microbianas locais, havendo uma perda de parte da população no hábitat secundário e resultando na persistência de algumas cepas de *E. coli* que possuam vantagens adaptativas (Rozen & Belkin, 2001; Walk et al., 2007; Ratajczak et al., 2010; Luo et al., 2011; Pachepsky & Shelton, 2011). Ou seja, a estrutura de uma população de *E. coli* em água reflete tanto a origem dos microrganismos, quanto as características particulares de sobrevivência de cada cepa. De acordo com alguns trabalhos, a associação da bactéria com algas e plantas e/ou com recursos abióticos do ambiente aquático é diretamente implicada na sobrevivência da *E. coli* em água, devido, principalmente, a uma absorção mais eficiente de nutrientes na coluna de água, pela formação de biofilmes (Garcia & Servais, 2009; Moreira et al., 2012).

O solo também pode ser um hábitat para cepas de *E. coli* muitas vezes provenientes de produtos agrícolas, fabricados com esterco animal, ou oriundas do depósito direto de fezes pelo gado pastando (Topp et al., 2003; Oliver et al., 2006). A persistência da *E. coli* no solo, uma questão fundamental quando se considera o risco de contaminação de águas circundantes, ainda não é bem definida, devido à falta de informação sobre os efeitos de fatores

bióticos do solo sobre os microrganismos. Esta sobrevivência diferencial entre cepas de *E. coli* pode refletir a capacidade de adaptação ao novo ambiente, através da redução do tamanho das células, de adaptações metabólicas à menor concentração de nutrientes ou de modificações químicas na membrana celular (Liang et al., 2011). Alterações em mecanismos celulares, como os envolvidos na sinalização química e na transferência de material genético entre os microrganismos, também são sugeridos como fatores significantes nesta adaptação (Ben-Jacob, 2003).

A existência de cepas de *E. coli* capazes de sobreviver e se multiplicar no solo pode ser útil na predição do risco potencial de outros patógenos entéricos também adquirerem esta capacidade. Uma melhor compreensão da resposta da *E. coli*, frente a uma variedade de fatores ambientais, é fundamental para a gestão da qualidade microbiana em bacias hidrográficas e o desenvolvimento de diretrizes higiênico-sanitárias, já que, o solo colonizado por *E. coli* pode ser transportado através de chuva, existindo a possibilidade de afetar a concentração deste coliforme em fontes de água e, assim, alterando os resultados de análises referentes à poluição fecal (Liang et al., 2011). Esta capacidade de persistir em habitats secundários pode implicar em uma atenuação da adequação da *E. coli* como microrganismo de escolha para análise de contaminação fecal em águas e alimentos (Solo - Gabriele et al., 2000).

2.3 Grupos Filogenéticos de *E. coli*

O estudo da proximidade evolutiva dentre os vários grupos de

organismos é chamado de Filogenia. A existência de distintos filogrupos ou 'subespécies' de *E. coli* é há muito reconhecida (Ochman & Selander, 1984; Selander et al., 1987; Herzer et al., 1990; Desjardins et al., 1995; Wirth et al., 2006). Com a utilização das técnicas de multilocus enzimático e ribotipificação, Selander et al. (1986) e Herzer et al. (1990) realizaram a caracterização de quatro grupos filogenéticos de *E. coli* : A, B1, B2 e D, contudo, as técnicas empregadas nestes trabalhos são dispendiosas e demoradas. A determinação do grupo filogenético pode ser feita de uma forma mais rápida e menos custosa, através de uma PCR multiplex. Neste método, desenvolvido por Clermont e colaboradores, no ano de 2000, são empregados três marcadores moleculares: *chuA* – um gene necessário para o transporte do grupo heme em *E. coli* enterohemorrágica (O157:H7) (Bonacorsi et al., 2000), *yjaA* – um gene identificado na sequenciamento do genoma de *E. coli* K12 (Blattner et al., 1997) e TspE4.C2 – um fragmento de DNA anônimo (Bonacorsi et al., 2000).

Tendo em vista os resultados obtidos, Clermont et al. (2000) constataram que o gene *chuA* estava presente em todas as estirpes pertencentes ao grupo B2 e D, mas ausente em todas as estirpes pertencentes aos grupos A e B1. Tal fato possibilitou a separação dos grupos B2 e D dos grupos A e B1. Do mesmo modo, o gene *yjaA* permitiu a discriminação entre o grupo B2 e D. Ao final, o marcador TspE4.C2 estava presente em todos menos em B1 e A (FIGURA 1). Os resultados das três ampliações por PCR permitiram o estabelecimento de uma árvore dicotômica para a determinação do grupo filogenético, sendo o método considerado satisfatório e adotado em vários trabalhos (Gordon et al., 2008).

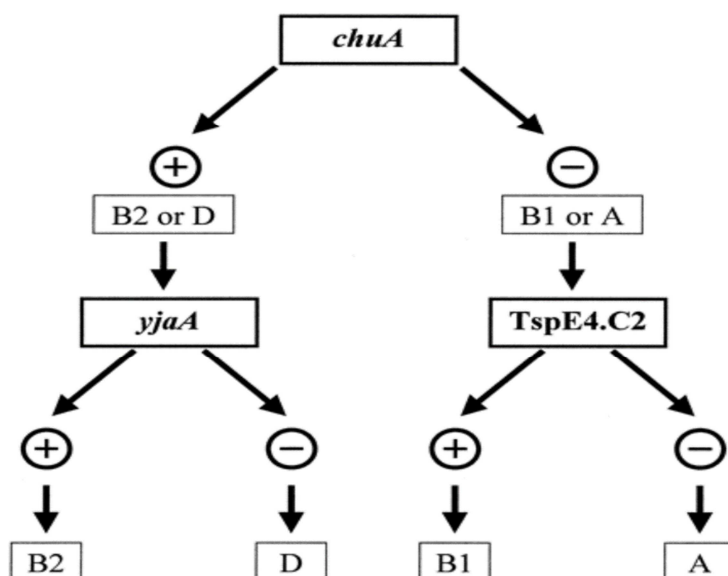


FIGURA 1 – Árvore dicotômica para determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli*, criada com base nos resultados das amplificações por PCR dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TspE4.C2.

As cepas destes quatro grupos filogenéticos diferem entre si em diversos aspectos, como as características fenotípicas, incluindo a capacidade de metabolizar diferentes açúcares, os perfis de resistência a antimicrobianos e as taxas de crescimento, quando relacionadas à temperaturas distintas (Gordon, 2004). O tamanho do genoma também é variado entre os grupos, tendo as cepas dos filogrupos A e B1 genomas menores quando comparadas as dos filogrupos B2 ou D (Bergthorsson & Ochman, 1998). A distribuição (presença ou ausência) de uma gama de genes, os quais conferem fatores de virulência às cepas, possibilitando sua patogenicidade em âmbito extraintestinal, é mais uma característica que difere entre as cepas dos quatro filogrupos (Johnson et al., 2001).

A distribuição filogenética de *E. coli* em habitats primários sofre influência da dieta do hospedeiro e do clima. As cepas pertencentes aos

filogrupos A e B1 são altamente adaptadas a humanos e animais vertebrados, sendo o filogrupo A predominante em seres humanos e as linhagens B1 em animais (Duriez et al., 2001; Gordon & Cowling, 2003; Skurnik et al., 2008). Curiosamente, outros trabalhos realizados concluíram que algumas cepas do filogrupo B1 apresentam a capacidade de persistir em ambientes hídricos e que os filogrupos B2 e D são ainda menos frequentes no ambiente, quando comparados aos filogrupos A e B1 (Walk et al., 2007; Gordon & Cowling, 2003; Ratajczak et al., 2010).

Diversos fatores de virulência associados a infecções extraintestinais estão distribuídos entre as linhagens dos quatro filogrupos. Cepas pertencentes ao filogrupo B2 foram relacionadas à ocorrência de doença extraintestinal, apresentando um maior número de fatores de virulência, tendo as cepas do filogrupo D esta mesma associação, contudo em menor grau (Pupo et al., 1997; Girardeou et al., 2005; Tiba et al., 2009; Da Silva & Mendonça, 2012). Em um estudo de Johnson e colaboradores, 2002, a maior parte dos isolados enteropatogênicos foi atribuída ao filogrupo D, sendo o filogrupo B2 associado a patótipos extraintestinais. Já os filogrupos A e B1 englobam cepas comensais e patogênicas, sendo considerados grupos irmãos (Clermont et al., 2000). O filogrupo B2 também é associado e considerado um representante de uma linhagem ancestral de *E. coli* (Lecointre et al., 1998).

A fidedignidade deste método foi avaliada, quando comparada a uma abordagem por *Multi Locus Sequencing Typing* (MLST), sendo constatado que 80-85% da atribuição dos filogrupos pelo método da PCR multiplex estava correta. Todavia, a exatidão dependia do genótipo definido pelo método, logo,

cepas que apresentaram genótipo consistente com os filogrupos B1 e B2 foram atribuídas corretamente em 95% das vezes, porém, os isolados que não produziram nenhum amplicon pelo método de Clermont et al. (2000) são, raramente, membros do filogrupo A e, dessa forma, tal genótipo não deveria ser atribuído a um filogrupo (Gordon et al., 2008). De todo modo, a técnica de PCR multiplex pode ter utilidade na prática clínica, por ser um método rápido e menos dispendioso, que permite a correlação entre grupos filogenéticos e potencial de virulência, sendo que a capacidade discriminatória da análise das populações de *E. coli* pode ainda ser incrementada pela utilização de subgrupos A0, A1, B1, B22, B23, D1, D2, os quais são determinados pela combinação dos marcadores genéticos (Escobar-Páramo et al., 2006).

2.4 Antimicrobianos e Multirresistência

Os antimicrobianos compreendem qualquer tipo de composto que apresente propriedades inibitórias parciais ou totais sobre o crescimento de um microrganismo. Há diversas teorias para a existência destes compostos na natureza, considerando-se que estes podem ser metabólitos microbianos utilizados contra outros microrganismos, tendo papel na competição por nutrientes ou servindo como mecanismos de defesa, atuarem como mensageiros químicos na comunicação entre os indivíduos, ou ainda apresentarem funções moduladoras de metabolismo em comunidades microbianas, tendo, assim, importância no processo de comunicação entre as células e funcionando como moléculas sinalizadoras em ecossistemas antimicrobianos. O termo antibiótico implica em que a fonte do agente

antimicrobiano seja natural, contudo, muitos agentes antimicrobianos, atualmente, derivam de uma síntese química (quimioterápicos). A ação dos antimicrobianos pode ser focada em distintos alvos. Estes compostos podem atuar a nível da inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese de ácidos nucleicos, enfraquecimento da membrana citoplasmática, inibição da síntese proteica e perturbação do metabolismo bacteriano (Fajardo & Martínez, 2008; Fernandes et al., 2013).

Atualmente os antimicrobianos disponíveis no mercado dividem-se em várias classes: quinolonas, macrolídeos, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, tetraciclina e β -lactâmicos. Todos os Antimicrobianos β -lactâmicos apresentam um anel β -lactâmico reativo, podendo ser divididos em subgrupos que incluem: penicilinas, carbapenemos, cefalosporinas e monobactams. Por sua natureza reativa, o anel β -lactâmico torna estes antimicrobianos mais suscetíveis a processos degradativos. Muitas bactérias produzem um grupo de enzimas, conhecidas coletivamente como penicilinases, capazes de inativar o anel β -lactâmico, através da clivagem da ligação amida. O tipo mais prevalente de penicilinase são as β -lactamases. Estas enzimas atacam e quebram as ligações β -lactâmicas, tornando o quimioterápico inofensivo para os microrganismos. Hoje existem compostos (ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam) capazes de se ligar às β -lactamases de modo irreversível, inativando estas enzimas e permitindo o tratamento com alguns antimicrobianos β -lactâmicos. (Gandolfi - Decristophoris et. al, 2013).

As cefalosporinas apresentam um mecanismo de ação análogo ao das penicilinas, formando uma ligação covalente com as sintetases do

peptidoglicano (PBPs), interferindo, deste modo, na sua formação e provocando, secundariamente, a lise celular. Conforme seu espectro de ação e a sua estabilidade, as cefalosporinas estão divididas em cinco gerações, tendo as mais recentes um amplo espectro de ação. Certos antimicrobianos desta classe são efetivos contra *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), entretanto, são ineficazes contra bactérias produtoras de β -lactamases que inativam antimicrobianos de largo espectro: as ESBLs (*extended spectrum β -lactamases*). A subdose das cefalosporinas no controle de infecções nosocomiais causadas por bactérias Gram-negativas, principalmente as de terceira geração, é reconhecida como um fator de risco para a seleção de novas cepas resistentes com importantes consequências epidemiológicas e no manejo clínico (Gandolfi - Decristophoris et. al, 2013).

Os antimicrobianos, após a sua introdução na prática clínica na década de 1940, salvaram milhares de vidas e, provavelmente, são uma das formas mais bem sucedidas de quimioterapia na história da medicina. Na época, foram extremamente eficientes na remoção de bactérias patogênicas e levando a cura de muitas pessoas acometidas por doenças infecciosas, promovendo a crença de que estas doenças se tornariam um problema solucionado. Todavia, os microrganismos têm demonstrado poder escapar à ação dos antimicrobianos utilizando diferentes formas, como, por exemplo, promovendo a alteração do sítio ativo do composto, através da perda de afinidade; da redução na passagem deste, pela diminuição da permeabilidade ou pela mutação em porinas, o que resulta numa menor concentração da substância dentro da célula; pela expulsão do antimicrobiano por mecanismos

de efluxo, ou ainda, o mais estudado, a metabolização de enzimas que utilizem como substrato as moléculas responsáveis pela ação antimicrobiana (Aminov, 2009; Fernandes et al., 2013).

Os diferentes mecanismos de escape empregados pelos microrganismos são codificados por vários genes, os quais são chamados de genes de resistência a antimicrobianos. Acredita-se que esses genes já existiam naturalmente em alguns microrganismos, envolvidos em mecanismos de proteção sendo, em parte, característicos de microrganismos produtores de antimicrobianos. No entanto, esses genes também existem em microrganismos não produtores de Antimicrobianos, o que traz a possibilidade de estarem relacionadas com o metabolismo da parede celular e com a formação de canais de transporte, sendo a resistência conferida por eles um efeito secundário da sua atividade fisiológica primária (Alonso et al., 2001).

O surgimento e a rápida disseminação de patógenos resistentes a antimicrobianos, especialmente bactérias multirresistentes aos medicamentos, durante as últimas décadas, denuncia a falta de conhecimento sobre a evolução dos processos ecológicos que ocorrem em ecossistemas microbianos (Aminov, 2009; Wright, 2010). A emergência e a propagação de bactérias resistentes acaba sendo um efeito secundário inevitável do uso constante de antimicrobianos, tanto na clínica médica quanto na medicina veterinária. A presença constante de antimicrobianos nos distintos habitats origina uma pressão seletiva, pois só sobrevivem as cepas portadoras de genes que possibilitem isso. Além do uso terapêutico em animais e humanos, os antimicrobianos são amplamente utilizados como agentes profiláticos e como

promotores do crescimento na pecuária, agricultura e na aquicultura, visando uma melhora na rentabilidade da produção (Smet et al., 2010). Em decorrência disso, microrganismos resistentes não ficam confinados apenas ao panorama clínico, como hospitais, mas aumentam drasticamente em animais de produção (espécies pecuárias) e de companhia. Estes animais também podem atuar como reservatórios de resistência, havendo a possibilidade de transmissão dessas bactérias aos humanos (ou vice-versa) ou apenas a transferência de genes, por contato direto ou através da cadeia de produção de alimentos.

Este panorama permite a disseminação de microrganismos de forma rápida para países distantes, se considerarmos o volume diário de transações comerciais e viagens realizados hoje (Hawkey & Jones, 2009). Esta seleção não ocorre somente com bactérias patogênicas, mas também com a microbiota comensal, e, de modo especial, com a microbiota intestinal, o que acaba criando um reservatório de genes de resistências e pode favorecer a aquisição destes genes por microrganismos mais virulentos (Andremont, 2003). Fatores ambientais, como a poluição por compostos como biocidas ou detergentes, ou a presença no ambiente de metais pesados, do mesmo modo podem contribuir para a seleção dessas bactérias resistentes, já que determinantes de resistência podem estar presentes em replicons que contêm outros elementos genéticos de seleção envolvidos na proteção contra estes compostos, possibilitando que espécies portadoras destes replicons consigam colonizar esses ambientes. O nível de resistência em bactérias como *E. coli* é considerado um bom indicador da pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos e, simultaneamente, dos problemas a serem esperados nos

microrganismos tidos como mais patogênicos (Van den Bogaard & Stobberingh, 2000; Alonso et al., 2001).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental do presente trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia 166 no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS).

3.1 Amostras

3.1.1 Coleta e processamento

Os 47 isolados multirresistentes de *E. coli* de origem ambiental são provenientes de amostras de água da Lagoa dos Patos, coletados entre os períodos do Outono/2007 e Verão/2008, em oito pontos geograficamente distintos. Estes isolados foram caracterizados e utilizados em um estudo anterior do grupo (Canal et al., 2010). Os isolados de origem animal foram obtidos a partir de fezes de aves e suínos enviadas ao laboratório para análise da presença de *E. coli* no período de 2011 a 2013, nos estados de Santa Catarina, Paraná e Goiás - Brasil. As amostras foram diluídas de 10^{-1} a 10^{-4} em água peptonada 0,1%, homogeneizadas, semeadas em Ágar MacConkey (Himedia), e incubadas por 24h à 37°C. Após o período de incubação, as

colônias que apresentaram coloração rosa intenso foram selecionadas e reisoladas em placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB - Himedia) e incubadas à 37°C por 24h. As colônias que apresentaram coloração brilho verde metálico foram identificadas, presumidamente, como *E. coli*, sendo a pureza dos isolados analisada pela coloração de Gram e, posteriormente, foram estocados em Caldo Brain Heart Infusion (BHI - Himedia) com 15% de glicerol a -20°C.

Os isolados de origem humana foram coletados junto a um laboratório de análises clínicas do Grupo SANI/ Passo Fundo – RS no ano de 2013. As amostras de urina, de pacientes ambulatoriais e hospitalares, foram inoculadas em Ágar Sangue de carneiro 5% e em Ágar MacConkey (Himedia) com alça calibrada de 1 µL. Após um período de incubação 24 a 48 horas à 36°C e em aerobiose, os isolados bacterianos foram identificados pela coloração de Gram e por provas bioquímicas, para a identificação de gênero e espécie, como: citrato, produção gás sulfídrico (H₂S), indol, motilidade, TSI, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e D-Sorbitol. Estes isolados, quando recebidos em nosso laboratório, foram reisolados em Ágar EMB e incubados à 37°C por 24h. Após o período de incubação, as colônias que apresentaram o aspecto brilho verde metálico foram confirmadas como *E. coli*.

A pureza e manutenção dos isoladas foi realizada conforme descrito anteriormente. Os isolados de origem ambiental e animal, foram identificados novamente, através de provas bioquímicas: citrato, produção gás sulfídrico (H₂S), indol, motilidade, TSI, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e D-Sorbitol.

3.1.2 Recuperação e manutenção dos

isolados

Todos os isolados foram recuperados em caldo BHI e incubados a 37°C por 24 horas. Para verificar se as culturas estavam puras, realizou-se o isolamento em placas contendo Ágar Triptona de Soja (TSA – Himedia). A manutenção de culturas puras foi realizada através da inoculação em tubos contendo Ágar TSA inclinado.

3.2 Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi avaliado através da técnica de difusão em Ágar Muller Hinton (Himedia) (*Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007*). Os isolados tiveram sua susceptibilidade testada frente a 15 antimicrobianos (TABELA 1).

TABELA 1– Antimicrobianos utilizados para a avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados *E.coli*.

Antimicrobianos	Concentração do disco	Sigla	Marca
Ampicilina	10 µg	AMP	Sensifar
Amoxicilina-ácido clavulânico	20/10 µg	AMC	Sensifar
Aztreonam	30 µg	ATM	Sensifar
Imipenem	30 µg	IPM	Sensifar
Cefoxitina	30 µg	CFO	Sensifar
Ceftazidima	30 µg	CAZ	Sensifar
Cefotaxima	30 µg	CTX	Sensifar
Cefepima	30 µg	CPM	Sensifar
Piperacilina- tazobactam	100/10 µg	PPT	Sensifar
Amicacina	30 µg	AMI	Sensifar
Gentamicina	30 µg	GEN	Sensifar
Cloranfenicol	30 µg	CLO	Sensifar
Sulfametoxazol-trimetoprima	23,75/1,25 µg	SUT	Sensifar
Tetraciclina	30 µg	TET	Sensifar
Norfloxacina	10 µg	NOR	Sensifar

Para a suspensão bacteriana de cada isolado, colônias isoladas de placas de Ágar TSA, foram suspensas em solução salina 0,9% até que atingissem a turbidez correspondente 0,5 da Escala de MacFarland. Tendo o inóculo pronto, os isolados foram semeados com suabes estéreis em placas de 150 mm contendo Ágar Muller Hinton. Os discos com os antimicrobianos foram dispostos com auxílio de uma pinça estéril nas placas já semeadas, sendo posteriormente incubadas por 18h a 35°C. Passado o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e os resultados reportados com base nos critérios estabelecidos pelo CLSI (2007), que possibilita classificar o perfil de cada isolado em sensível, intermediário e resistente. Todos os isolados que apresentaram perfil intermediário a antimicrobianos foram incluídos na categoria de susceptibilidade reduzida. Os isolados foram considerados multirresistentes quando apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (Picão & Gales, 2007).

Para testar a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), foi empregada a metodologia de disco aproximação. Nesta metodologia os discos de Ceftazidima, Cefepime e Cefotaxima foram posicionados a três centímetros de distância de um disco de Amoxicilina - Ácido clavulânico. O surgimento de uma deformação no halo de inibição ou o aparecimento de uma zona fantasma, entre o substrato (Ceftazidima, Cefotaxima, Cefepime) e o inibidor (Amoxicilina- Ácido clavulânico), caracteriza fenotipicamente o isolado como produtor de ESBLs (Livermore et al., 2001).

3.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada conforme descrito por Misbah et al. (2005), com modificações. Os isolados foram cultivados em placas contendo Ágar TSA a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foram selecionadas de duas a três colônias, as quais foram suspendidas em 100 µL de água MiliQ e fervidas por 10 minutos. Após a fervura, os isolados foram centrifugados a 12000g por 10 minutos, sendo o sobrenadante resultante (contendo o DNA bacteriano) separado e armazenado a -20°C para posterior utilização.

3.4 Identificação de filogrupos de *E. coli*

A determinação filogenética dos isolados foi realizada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tendo como base o protocolo descrito por Clermont et al. (2000). Foram utilizados os três conjuntos de oligonucleotídeos descritos por Clermont et al. (2000), os quais classificam os filogrupos de *E. coli*. Os oligos utilizados e as respectivas sequências nucleotídicas encontram-se enumerados na TABELA 2. Foram utilizados controles internos sabidamente positivos, para os três marcadores moleculares, em todas as reações.

TABELA 2: Oligos utilizados, respectivas sequências e tamanho dos amplicons obtidos, para determinação dos filogrupos dos isolados de *E. coli*.

Oligos	Sequencia nucleotídica (5'-3')	Temperatura de anelamento	Produto de amplificação
<i>chuA</i>	ChuA1 - GACGAACCAACGGTCAGGAT ChuA2 - TGCCGCCAGTACCAAAGACA	58°C	279 pb
<i>yjaA</i>	YjaA1 - TGAAGTGTCAGGAGACGCTG YjaA2 - ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	60°C	211 pb
TspE4.C2	TspE4C2.1-GAGTAATGTCGGGGCATTCA TspE4C2.2- CGCGCCAACAAAGTATTACG	55°C	152 pb

As reações de amplificação foram realizadas em misturas contendo 3,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 1µM de cada oligonucleotídeo, 1U de Taq DNA-polimerase, 1X de tampão de reação da Taq DNA-polimerase e 2 µL de DNA bacteriano em um volume final de reação de 25 µL. Foi utilizado o aparelho *Termociclador Mastercycler Personal* (Eppendorf) nas seguintes condições de amplificação para os três oligos: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento variando de 55°C a 60°C por 1 minuto, conforme cada oligo (TABELA 2), e extensão a 72°C por 1 minuto, somados a um ciclo final de extensão de 72°C, por 10 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (apêndice 8.1.1), corado por solução de brometo de etídio, a uma corrente elétrica de 100V por aproximadamente 1 hora em tampão TAE 1X (apêndice 8.1.2). O gel foi então visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografado com câmera digital Kodak 1D. A identificação dos filogrupos foi possível pela verificação da presença ou ausência dos amplicons nos três pesos possíveis, sendo a interpretação dos resultados realizada com base em uma chave dicotômica criada por Clermont

et al. (2000) (FIGURA 1).

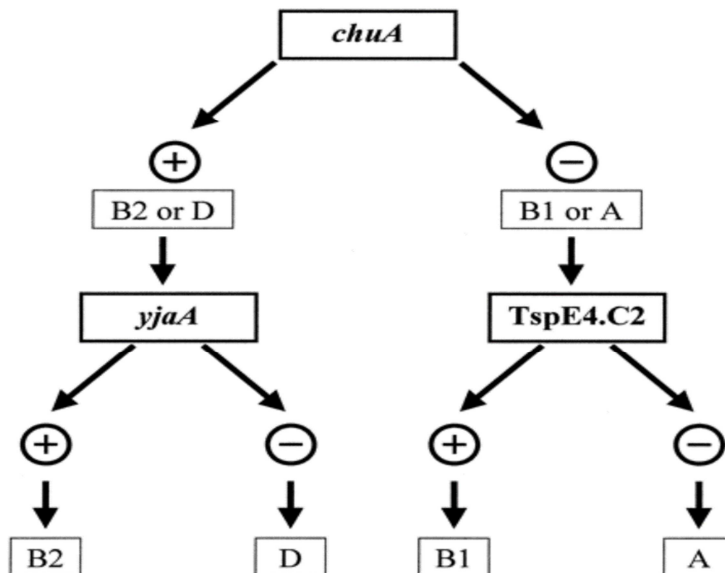


FIGURA 1 – Árvore dicotômica para determinação dos grupos filogenéticos de *E. coli*, criada com base nos resultados das amplificações por PCR dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TspE4.C2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

De um total de 178 isolados de *E. coli* de origem humana e animal avaliados, foram selecionados 157 isolados de *E. coli* multirresistentes a antimicrobianos, sendo 32 isolados de origem humana, 44 de origem suína, 34 de aves, somados aos 47 isolados de origem ambiental já citados. Dentre os antimicrobianos testados, a ampicilina e a tetraciclina (em torno de 96%), o sulfametoxazol – trimetoprim (70%), o clorafenicol (67,5%) e a norfloxacin (46%) foram aqueles a que uma maior porcentagem de isolados, do total analisado, apresentou resistência. Os isolados de origem humana e avícola apresentaram os maiores percentuais de multirresistências aos antimicrobianos testados, o que indica uma exposição continuada destas populações a uma gama mais ampla de antimicrobianos. Em relação aos antimicrobianos clorafenicol e sulfametoxazol - trimetoprim, constatamos que os maiores percentuais de resistência foram verificados entre os isolados de origem ambiental e animal (TABELA 3).

TABELA 3: Perfil de susceptibilidade dos isolados de *E. coli* multirresistentes a antimicrobianos.

Resistência percentual dos isolados por origem				
Antimicrobianos	Humana	Suína	Avícola	Ambiental
AMP	97%	100%	97%	96%
AMC	56%	16%	47%	21%
ATM	34%	18%	68%	0
AMI	41%	14%	21%	4%
CAZ	31%	5%	24%	0
CLO	41%	93%	50%	74%
CFO	34%	0	35%	0
CTX	25%	11%	82%	0
CPM	19%	2%	44%	0
IPM	3%	0	0	0
GEN	50%	23%	59%	0
PPT	37%	9%	24%	4%
NOR	56%	48%	88%	6%
TET	91%	91%	97%	100%
SUT	47%	70%	65%	89%

Antimicrobianos: ampicilina (AMP), amoxicilina – ácido clavulânico (AMC), aztreonam (ATM), imipenem (IPM), cefoxitina (CFO), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), cefepima (CPM), piperacilina – tazobactam (PPT), amicacina (AMI), gentamicina (GEN), clorafenicol (CLO), tetraciclina (TET), norfloxacina (NOR) e sulfametoxazol – trimetoprim (SUT).

Concordando com nossos resultados, em um estudo realizado com isolados de *E. coli* de origem ambiental (rio), de águas residuais de uma estação de tratamento e de origem humana, também foi observado um elevado índice de resistência a sulfametoxazol (99%), a ampicilina (82%), a tetraciclina (76%) e a norfloxacina (42,5%), entretanto, a porcentagem de resistência ao clorafenicol (34,4%) foi menor que as obtidas neste estudo (57,5%) para os isolados de origem humana e ambiental. Neste estudo também foi constatado que a resistência a antimicrobianos era mais frequente entre os isolados de origem humana, se comparado aos de origem ambiental, provavelmente por serem isolados obtidos de amostras clínicas de pacientes hospitalizados. Foi

percebida a influência do despejo das águas residuais no rio em relação ao perfil de multirresistência dos isolados coletados no ambiente, tendo em vista que, os isolados coletados a jusante do ponto de despejo, em comparação com aqueles coletados a montante do mesmo ponto, apresentaram maior porcentagem de resistência a fluoroquinolonas, canamicina, cefalotina, cotrimoxazol e trimetoprim exibindo, assim, uma gama ampla de multirresistência (Koczura et al., 2012).

Yan-yan Hu et al. (2013), trabalhando com 139 isolados de *E.coli* proveniente do ambiente, de suínos, de humanos saudáveis e de pacientes hospitalizados, verificaram 100% de resistência contra cefotaxima e ceftriaxona (cefalosporinas de terceira geração), entretanto, uma relativa susceptibilidade contra cefoxitina, ceftazidima e cefepima, sendo que, as duas últimas também são cefalosporinas de terceira e quarta geração. Este fato, segundo os autores, poderia sugerir o desenvolvimento de mecanismos de resistência pela exposição continuada aos antimicrobianos. Neste mesmo trabalho, independentemente da origem dos isolados, as análises revelaram um elevado nível de resistência contra fluoroquinolonas (61,9%). Em nosso trabalho, a porcentagem de resistência a cefalosporinas não foi tão elevada, com excessão da cefotaxima no conjunto de isolados avícolas (82%), mas foi muito presente, particularmente dentre os isolados de origem avícola e humana, o que sugere que nossas populações de estudo também possam estar sendo expostas de forma indiscriminada a estes antimicrobianos (TABELA 3).

Quando analisado somente o conjunto de isolados de origem humana, os perfis de resistência a quatro antimicrobianos (6 isolados - 19%) e

a seis antimicrobianos (7 isolados - 22%) foram os mais frequentes. O índice de resistência foi mais elevado para os antimicrobianos ampicilina e tetraciclina (acima de 90%), amoxicilina – ácido clavulânico e norfloxacin (56% para ambos), gentamicina (50%) e sulfametoxazol – trimetoprim (47%), tendo os demais antimicrobianos uma taxa média de 29,4% de resistência. Somente um isolado deste grupo foi resistente a 14 dos 15 antimicrobianos testados, sendo o único a ter apresentado resistência ao imipenem (3%) (TABELA 3).

No trabalho de Koczura et al., 2012, entre os isolados clínicos, a resistência aos aminoglicosídeos, cefalosporinas e aztreonam foi prevalente, tendo em vista que, os microrganismos foram isolados de pacientes hospitalizados, havendo, possivelmente, pressão seletiva do ambiente hospitalar. Em nosso trabalho, a resistência a estas classes de antimicrobianos variou de 25% a 50%, com exceção da cefepima (19%), talvez por ser uma cefalosporina de quarta geração. Em um estudo realizado no Japão, Matsumura et al. (2012) realizaram a análise de 581 isolados de *E. coli* produtoras de ESBLs de origem clínica, coletados ao longo de dez anos. A multirresistência a antimicrobianos também foi observada, sendo mais elevada a resistência para ampicilina - sulbactam (77%), ciprofloxacina (63%) e sulfametoxazol – trimetoprim (57%), havendo, como em nossos resultados, uma baixa porcentagem de isolados resistentes ao imipenem (0,3%).

No conjunto de isolados de origem suína, todos os isolados foram resistentes a ampicilina. A resistência ao clorafenicol e a tetraciclina ficou acima dos 90%, sendo de 70% ao sulfametoxazol – trimetoprim e 48% à norfloxacin. A resistência média aos demais antimicrobianos foi de 12%. Neste grupo, o

perfil de multirresistência a quatro ou cinco antimicrobianos teve uma representatividade maior, englobando 61% dos isolados. Nenhum dos isolados de suínos apresentou resistência ao imipenem e a cefoxitina (TABELA 3).

Estes resultados condizem com um estudo realizado em uma fazenda de criação de suínos em Portugal, no qual isolados de *E. coli* produtores de beta-lactamases (oriundos de amostras de fezes de animais saudáveis) foram analisados, sendo, do mesmo modo, elevada a resistência a tetraciclina (87%), entretanto, a resistência a estreptomicina foi de 69%, enquanto que, em nosso trabalho, a resistência a esta classe de antimicrobiano foi mais baixa, não ultrapassando os 23%. Os autores sugeriram que a origem e a disseminação da multirresistência está relacionada ao uso de cefalosporinas de amplo espectro, na produção animal, ou a utilização de outros agentes antimicrobianos (como quinolonas, tetraciclina e aminoglicosídeos), podendo até representar um risco para a segurança alimentar (Gonçalves et al., 2010). Da mesma forma, no trabalho de Drummond & Perecmanis, 2013, aonde foram analisados 127 isolados de *E. coli* de suínos hígidos, os níveis de resistência para sulfonamidas (74,8%) e tetraciclina (70,1%) foram elevados. Estes níveis de resistência, segundo os autores, podem decorrer do uso costumeiro destes antimicrobianos na suíno cultura, como promotores de crescimento, tanto no tratamento de doenças provocadas por *E. coli*, como também para o controle profilático das mesmas.

Dentre os isolados de origem avícola foram constatadas percentagens mais altas de resistência a um número maior de antimicrobianos. Os níveis de resistência para ampicilina e tetraciclina foram iguais (97%), para

norfloxacin e cefotaxima ficaram em torno de 85% e para aztreonam, sulfametoxazol – trimetropim, gentamicina, clorafenicol, amoxicilina – ácido clavulânico e cefepima variaram de 68% a 44%, sugerindo a ampla utilização de antimicrobianos no manejo destes animais na avicultura. Os demais antimicrobianos tiveram uma porcentagem média de resistência de 26%, sendo também mais elevada, se comparada aos outros conjuntos de isolados. Quanto a resistência a um número maior de antimicrobianos, 44% dos isolados deste grupo apresentou multirresistência a nove ou a dez antimicrobianos (TABELA 3).

Rybarikova et al., 2010, realizaram um trabalho aonde foram analisados isolados de *E. coli* provenientes de moscas e de fezes de andorinhas, habitantes de uma fazenda de gado leiteiro. Entre os isolados de moscas, 89% destes foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados e 80% eram multirresistentes, com resistência a cinco ou mais drogas. Para os autores, houve uma associação entre a resistência à tetraciclina em conjunto com estreptomicina e sulfonamidas, pois 71% dos isolados foram resistentes a estes três antimicrobianos. As resistências ao sulfametoxazol - trimetropim e ao clorafenicol também foram elevadas, sendo de 81% e 77%, respectivamente, entretanto, a resistência a cefalotina, ciprofloxacina e amoxicilina – ácido clavulânico foram baixas, não sendo detectada resistência a ceftazidima em nenhum dos isolados. Os autores concluíram que a população de moscas pode adquirir e transmitir elementos de resistência no ambiente de manejo dos animais, pois elas entram em contato com o gado e suas fezes e, da mesma forma que aves e suínos, estes são hospedeiros

primários de *E. coli* em sua microbiota intestinal.

Em relação ao conjunto de isolados de origem ambiental, o perfil de multirresistência foi mais restrito, pois 62% dos isolados foram resistentes a somente quatro antimicrobianos. O percentual de resistência foi elevado para tetraciclina e ampicilina (96 a 100%), sulfametoxazol – trimetoprim (89%) e cloranfenicol (74%), porém, os demais antimicrobianos tiveram uma resistência média somente de 9%. Nenhum destes isolados apresentou resistência para os antimicrobianos aztreonam, imipenem, cefoxitina, ceftazidima, cefotaxima, cefepima e gentamicina (TABELA 3).

Em um trabalho realizado em Bangladesh, onde 233 isolados de *E. coli* foram obtidos de amostras de água da rede de abastecimento da capital, foi avaliada a susceptibilidade a 16 antimicrobianos distintos e a presença de genes associados avirulência. Quase 36% destes isolados apresentaram perfil de multirresistência, sendo as porcentagens de resistência a ampicilina (57%) e a tetraciclina (45%) mais elevadas, coincidindo com os resultados do nosso estudo, porém, neste trabalho, a resistência dos isolados ao sulfametoxazol-trimetoprim foi de 36% e somente de 8% ao cloranfenicol, divergindo bastante dos nossos achados. A presença de plasmídeos, associados a transferência de resistência a ampicilina, ceftriaxona, sulfametoxazol-trimetoprim e a tetraciclina, foi detectada em todos os isolados multirresistentes. Cerca de 7% dos isolados portavam genes de virulência característicos de *E.coli* patogênicas. Somado a isso, uma maior frequência deresistência contra beta-lactâmicos, quinolonas e fluoroquinolonas foi observada entre os isolados neste mesmo estudo, levando os autores a conclusão de que *E.coli* multirresistentes são amplamente

distribuídas na rede de abastecimento público de água, na cidade de Dhaka, e que tal fato representaria uma séria ameaça para a saúde pública em áreas urbanas (Talukdar et al., 2013).

Estes achados poderiam ter uma associação com os perfis de multirresistência encontrados em nosso estudo, já que o ponto de coleta de grande parte dos isolados era próximo a uma área urbana. Outro trabalho, realizado em Portugal, avaliou os fenótipos de resistência a antimicrobianos num grupo de 220 *E.coli* isoladas de um estuário no sul do país. Entre estes isolados, 65,16% eram resistentes a pelo menos um dos 17 antimicrobianos testados e, contudo, a multirresistência foi constatada somente em 19% dos isolados. A resistência à estreptomicina foi a mais elevada (39%), seguida por tetraciclina (23,8%), ambas porcentagens bem menores quando comparadas aos nossos resultados. Como em nosso trabalho, baixas porcentagens de resistência foram obtidas para os antimicrobianos gentamicina (6,7%), piperacilina – tazobactam (6,3%), ceftazidima (5,4%), amoxicilina–ácido clavulânico e ciprofloxacina (4% cada), imipenem (2,7%) e cefotaxima (1,8%). Segundo os autores, a prevalência de resistência a antimicrobianos entre *E.coli* que circulam no estuário em questão foi alta, devido a origem dos isolados, sendo relevante a ocorrência de resistência a drogas utilizadas como último recurso no tratamento de infecções, indício de uma provável contaminação ambiental (Pereira et al., 2013).

4.2 Determinação filogenética e incidência

Dentre os 157 isolados de *E. coli* multirresistentes analisados neste

estudo, os filogrupos A (34%) e B1 (49%) foram os mais prevalentes, independentemente da origem dos isolados e os filogrupos D e B2 foram os menos prevalentes, com 11% e 6% de representatividade, respectivamente (TABELA 4). Estes resultados sugerem que os isolados deste estudo são, em sua maioria, associados a microbiota comensal de humanos e animais e não à cepas de *E. coli* com perfis de patogenicidade maior, conforme o estudo de Clermonte et al., 2000, no qual os filogrupos A e B1 foram os mais associados a isolados comensais, enquanto que os isolados dos filogrupos B2 e D, em outros estudos, foram mais associados a doenças extraintestinais, apresentando um número maior de fatores de virulência (Duriez et al., 2001; Sabaté et al., 2006; Tenaillon et al., 2010). Gordon, 2004, também afirma que os isolados obtidos de ambientes extraintestinais de hospedeiros são mais propensos a pertencer aos filogrupos B2 ou D do que aos filogrupos A ou B1, o que, mais uma vez, confirma nossas suposições.

TABELA 4: Distribuição em filogrupos dos isolados multirresistentes de *E. coli*.

Filogrupo	ECH (n=32)	ECS (n=44)	ECAv (n=34)	ECAm (n=47)	Total (n=157)
A	47%	61%	14%	15%	34%
B1	19%	30%	77%	68%	49%
B2	15%	2%	0	6%	6%
D	19%	7%	9%	11%	11%

ECH: *E. coli* de origem humana; ECS: *E. coli* de origem suína; ECAv: *E. coli* de origem avícola; ECAm: *E. coli* de origem ambiental.

Os isolados de origem humana foram classificados em sua maioria no filogrupo A (47%), tendo os filogrupos B1 e D uma representatividade de

19%, sendo menos encontrado o filogrupo B2, englobando 15% dos isolados (TABELA 4). É observada que a classificação filogenética neste conjunto foi, de certa modo, mais regular que os demais conjuntos de isolados. Tais resultados coincidem com os relatados por Damborg et al., 2009, onde o filogrupo A foi mais associado aos isolados de origem humana (32%), sendo sucedido pelo filogrupo B1 e D, ambos com 26% de representatividade, e por último o filogrupo B2 (15%), dados que também demonstram uma distribuição filogenética regular entre os filogrupos. Em um levantamento bibliográfico realizado por Tenailon et al., 2010, constatou-se que entre isolados de origem humana, o filogrupo A é predominante (40,5%), seguido pelo filogrupo B2 (25,5%), sendo menos frequentes os filogrupos B1 e D (17% para ambos), dados que divergem em parte dos encontrados por nós. Estas divergências podem ser explicadas, segundo este mesmo trabalho, pela alta variação genética dentro de uma mesma espécie, pois os fatores que moldam a estrutura genética de uma população de microrganismos sofrem influência de características do hospedeiro e de fatores ambientais.

Dentre os isolados de origem animal (suínos e aves), os filogrupos mais representativos foram o A e B1. Os isolados de origem suína foram classificados em sua maioria dentro do filogrupo A (61%), seguido pelo B1 (30%), e bem poucos dentro dos filogrupos D (7%) e B2 (2%). Já entre os isolados de origem avícola, a percentagem de isolados classificados no filogrupo B1 foi relevante (77%), sucedido pelos filogrupos A (14%) e D (9%). Nenhum dos isolados avícolas foi classificado no filogrupo B2 (TABELA 4). Provavelmente estes foram os filogrupos mais representativos, porque são

mais associados a microbiota comensal de vertebrados, como descrito em outros trabalhos, onde os isolados de origem animal foram predominantemente classificados no filogrupo B1 e A, tendo os filogrupos B2 e D menor representatividade (Tenailon et al., 2010; Damborg et al., 2009).

Wagner et al., 2014, trabalhando com isolados de *E. coli* multirresistentes a antimicrobianos, obtidos a partir de cães com infecção no trato urinário, encontrou um número maior de isolados classificados no filogrupo D (33%), tendo os filogrupos A (28%) e B1 (22%) similar representatividade. O filogrupo B2 foi encontrado em menor proporção (11%). A alta incidência do filogrupo D pode estar associada justamente a origem dos isolados (Sabaté et al., 2006). Em um estudo, aonde foram avaliados 204 isolados de *E.coli* obtidos de carcaças de frango, a distribuição dos mesmos em filogrupos foi, em parte, semelhante aos nossos resultados, tendo os filogrupo A maior representatividade (56,86%), contudo, os filogrupos B1 e D tiveram o mesmo percentual de incidência (19,12% cada), enquanto que entre nossos isolados avícolas, o filogrupo B1 teve uma incidência muito mais expressiva. Neste mesmo trabalho, o filogrupo B2 mais uma vez foi pouco encontrado (4,90%), indicando que de fato é pouco associado a isolados de origem animal (Bagheri et al., 2014).

Ghanbarpour & Daneshdoost, 2012, trabalhando com 138 *E.coli* isoladas a partir de fezes de pombos observaram, do mesmo modo, o predomínio dos filogrupos A e B1, encontrando a seguinte distribuição filogenética dentre seus isolados: filogrupo A (54,34%), B1 (34,05%), D (7,79%) e B2 (3,62%). Há de se observar que o filogrupo D é encontrado em

porcentagens mais variáveis entre isolados de origem animal. Outro trabalho também relacionou isolados de peixes, anfíbios, répteis e amostras ambientais a classificação, em sua maioria, dentro dos filogrupos A ou B1, condizendo com os resultados obtidos em nosso estudo (Gordon & Cowling, 2003).

No conjunto de isolados de origem ambiental, o filogrupo B1 teve um alto predomínio (68%), tendo os filogrupos A e D uma porcentagem similar de ocorrência (15% e 11%, respectivamente), ficando mais uma vez o filogrupo B2 com a menor incidência (6%) (TABELA 4). Segundo Walk et al., 2007, os filogrupos B2 e D são menos frequentemente isolados de amostras ambientais. Estes autores também sugerem que o filogrupo B1 pode ser encontrado em alta prevalência em ambientes aquáticos pelo fato de que muitas das cepas deste filogrupo possuem a capacidade de sobreviver no ambiente, podendo, assim, não serem bons indicadores de contaminação ambiental.

Nas análises realizadas por Pereira et al., 2013, com 220 isolados de *E. coli* provenientes de diferentes pontos de um estuário, o filogrupo A foi o mais prevalente (48,4%), seguido pelo filogrupo D (27,6%) e B1 (22,6%). O filogrupo B2 foi, do mesmo modo, o menos prevalente (1,4%). Neste mesmo estudo, os autores constataram variações nas porcentagens de incidência do filogrupo B1, relacionando uma maior prevalência de isolados deste filogrupo a pontos de coleta com forte influência de uma possível contaminação pela indústria alimentar e pela agricultura intensiva. Nossas amostras ambientais, em sua maioria, também foram coletas perto de uma área urbana (cidade de Rio Grande, Estuário da Lagoa dos Patos), o que poderia, de forma semelhante, associar o ponto de coleta à alta incidência do filogrupo B1.

4.3 Filogrupos de *E. coli* e multirresistência a antimicrobianos

O perfil de multirresistência observado entre todos os grupos filogenéticos foi bastante heterogêneo. Os isolados dos filogrupos A e B1 apresentaram multirresistência a um maior número de antimicrobianos, seguidos pelos isolados do filogrupo D e por último do filogrupo B2. Foram obtidos 84 perfis distintos de multirresistência entre os 157 isolados avaliados. O perfil de multirresistência mais encontrado foi o de resistência a ampicilina, ao clorafenicol, a tetraciclina e ao sulfametoxazol – trimetropim, somando 31 isolados de origem ambiental e suína, sendo que destes, 21 isolados eram de origem ambiental e pertencentes ao filogrupo B1. Um número maior de perfis distintos de multirresistência foi encontrado entre os isolados de origem humana e suína classificados no filogrupo A. Esta mesma diversidade foi maior entre os isolados de aves e ambientais pertencentes ao filogrupo B1 (TABELA 5).

TABELA 5: Perfil de multirresistência a antimicrobianos e distribuição filogenética dos isolados de *E. coli*.

Perfis de Multirresistência a Antimicrobianos														Origem dos isolados de <i>E.coli</i>															
														Humana (n= 32)				Suína (n= 44)				Avícola (n= 34)				Ambiental (n= 47)			
														A	B1	B2	D	A	B1	B2	D	A	B1	D	A	B1	B2	D	
AMP AMC ATM IPM CFO CAZ CTX CPM PPT GEN CLO TET NOR SUT	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CFO CAZ CTX CPM PPT AMI GEN CLO TET NOR SUT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CTX CPM PPT AMI GEN CLO TET NOR SUT	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CFO CTX PPT AMI GEN CLO TET NOR SUT	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CFO PPT AMI GEN CLO TET NOR SUT	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CFO CTX PPT AMI GEN CLO TET NOR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0														
AMP AMC ATM CAZ CTX CPM PPT AMI GEN TET SUT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CFO CAZ CPM PPT AMI GEN TET	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0														
AMP ATM CFO CAZ CTX CPM PPT AMI GEN TET	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0														
AMP ATM CFO CTX CPM PPT AMI GEN TET NOR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CFO CTX CPM PPT TET NOR SUT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CFO CTX PPT CLO TET NOR SUT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CTX CPM PPT GEN TET NOR SUT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CFO CAZ CTX CLO TET NOR SUT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0														
AMP AMC CFO PPT AMI GEN CLO TET NOR	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0														
AMP CTX CPM AMI GEN CLO TET NOR SUT	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0														
AMP ATM CFO CAZ AMI GEN CLO TET NOR	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CTX CPM GEN TET NOR SUT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0														
AMP AMC CFO CAZ CTX CLO TET NOR SUT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CTX CPM AMI GEN TET NOR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CTX CPM PPT GEN TET NOR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0														
AMP ATM CTX CPM GEN CLO TET NOR SUT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0														
AMP ATM CFO CTX CPM GEN TET NOR SUT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CFO CAZ AMI GEN TET	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CTX CPM PPT TET SUT	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CTX PPT AMI GEN NOR	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0														
AMP AMC ATM CFO CAZ CTX TET NOR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0														
AMP ATM CTX CPM GEN CLO TET NOR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0														

Perfis de Multirresistência a Antimicrobianos								Origem dos isolados de <i>E.coli</i>																	
								Humana (n= 32)				Suína (n= 44)				Avícola (n= 34)				Ambiental (n= 47)					
								A	B1	B2	D	A	B1	B2	D	A	B1	D	A	B1	B2	D			
AMP	ATM	CTX	CPM	GEN	TET	NOR	SUT	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AMP	ATM	PPT	AMI	CLO	TET	NOR	SUT	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMC	PPT	GEN	CLO	TET	NOR	SUT	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMC	ATM	CAZ	CLO	TET	NOR	SUT	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMC	ATM	GEN	CLO	TET	NOR		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	ATM	CFO	CAZ	AMI	GEN	TET		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	PPT	AMI	CLO	TET	NOR	SUT		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	ATM	CTX	AMI	GEN	TET	NOR		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	ATM	CTX	CPM	GEN	TET	SUT		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	CTX	CPM	CLO	TET	NOR	SUT		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMC	PPT	AMI	GEN	TET	SUT		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMC	CTX	PPT	AMI	TET	SUT		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMC	CFO	PPT	AMI	GEN			0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMC	PPT	AMI	CLO	TET			0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	CAZ	GEN	TET	NOR	SUT			1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMC	CLO	TET	NOR	SUT			0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMC	GEN	CLO	TET	NOR			1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMC	ATM	CFO	CAZ	CTX			0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	CFO	GEN	CLO	TET	NOR			1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	ATM	CAZ	CLO	TET	SUT			0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	ATM	CTX	GEN	TET	NOR			0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	GEN	CLO	TET	NOR	SUT			0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	GEN	CLO	TET	NOR				0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	CLO	TET	NOR	SUT				0	0	0	0	1	6	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
AMP	GEN	CLO	TET	SUT				0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	CTX	CLO	TET	SUT				0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	CTX	GEN	CLO	TET				0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	CTX	CLO	TET	NOR				0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMC	CLO	TET	SUT				0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	5	2	0	0	0	0	0

Perfis de Multirresistência a Antimicrobianos					Origem dos isolados de <i>E.coli</i>														
					Humana (n= 32)				Suína (n= 44)				Avícola (n= 34)			Ambiental (n= 47)			
					A	B1	B2	D	A	B1	B2	D	A	B1	D	A	B1	B2	D
AMP	AMC	CFO	CAZ	CTX	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMC	TET	NOR	SUT	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMC	PPT	TET	SUT	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	GEN	TET	NOR	SUT	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
AMP	GEN	CLO	SUT		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	GEN	TET	NOR		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMC	CLO	NOR		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMI	CLO	TET		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AMP	CLO	TET	NOR		0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	CLO	TET	SUT		0	0	0	0	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	AMC	TET	SUT		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
AMP	AMC	CLO	TET		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ATM	CAZ	CLO	TET		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	TET	NOR	SUT		1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	CLO	TET	SUT		0	0	0	0	5	0	0	2	0	0	0	0	21	3	0
AMP	CLO	PPT	TET		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
CLO	TET	NOR	SUT		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
AMI	TET	SUT			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AMP	AMI	NOR			0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AMP	AMC	TET			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AMP	CLO	TET			0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	CLO	NOR			0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	PPT	TET			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
AMP	TET	CLO			0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AMP	TET	SUT			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	2
AMP	TET	NOR			0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
TOTAL	84 perfis				15	6	5	6	17	8	1	2	5	21	2	3	8	1	3

Em relação aos isolados de origem animal, no filogrupo B1 a multirresistência foi predominante entre os isolados avícolas, tendo estes apresentado uma gama maior de resistência, havendo isolados com perfis de resistência de 3 a 14 antimicrobianos. O perfil de resistência a 9 ou a 10 antimicrobianos foi o mais encontrado, ficando em torno dos 30%. Os isolados de origem suína, deste filogrupo, tiveram perfil de resistência variando de 3 a 8 antimicrobianos, sendo mais prevalente a resistência a 5 drogas (TABELA 5).

Tais perfis podem ser explicados pela exposição destes animais a antimicrobianos na rotina de criação, pois a resistência a antimicrobianos é associada ao uso de drogas de amplo espectro no tratamento de animais para abate, influenciando no surgimento e disseminação de microrganismos multirresistentes encontrados em animais de corte e no ambiente em que vivem (Macêdo et al., 2007).

Os isolados de suínos, mais prevalentes no filogrupo A, tiveram um perfil de multirresistência mais brando, pois poucos isolados foram multirresistentes a um número maior de antimicrobianos (de 8 a 12 drogas), sendo mais comum o perfil de resistência a 4 drogas (52% dos isolados). Os poucos isolados de origem avícola, classificados no filogrupo A, também apresentaram resistência a um número menor de antimicrobiano, pois 40% destes foram resistentes a 5 ou 7 drogas (TABELA 5).

Dentre os isolados de origem animal classificados no filogrupo D, aqueles de origem avícola foram também associados a perfis mais amplos de multirresistência, já que 33% destes foram resistentes a 11 antimicrobianos,

contudo, a maior parte deles eram resistentes a somente 5 drogas. Entre os isolados de origem suína classificados no filogrupo D, os perfis de multirresistência foram restritos, variando de 4 a 5 antimicrobianos (TABELA 5).

Por estes resultados, podemos notar uma variedade muito grande de percentagens de multirresistência associada a classificação filogenética, no conjunto de isolados obtidos de origem animal. Talvez este fato possa estar ligado à adaptações dos microrganismos ao habitat, que permitam cepas mais patogênicas de *E.coli* a possibilidade de estabelecer associações com cepas comensais, proporcionando o trânsito de fatores de virulência em microambientes dentro de um mesmo hospedeiro (Alteri & Mobley, 2012; Croxen & Finlay, 2010).

No conjunto de isolados de origem humana, aqueles classificados no filogrupo B1 também tiveram perfis mais restritos de multirresistência, sendo mais comum a resistência a 4 ou 6 antimicrobianos (33% em ambos) (TABELA 5). De modo distinto, o perfil de multirresistência a antimicrobianos, dos isolados de origem humana do filogrupo A, englobou um número maior de antimicrobianos, de 4 a 14 drogas, entretanto, as percentagens de isolados resistentes a mais que 9 antimicrobianos foram baixas, apresentando, a maioria destes isolados, a faixa de resistência de 4 a 6 antimicrobianos (TABELA 5).

Os isolados de origem humana do filogrupo D apresentaram perfis de multirresistência a um número maior de antimicrobianos (de 5 a 9 drogas), sendo mais encontrada a multirresistência a 7 drogas (33%) (TABELA 5). Os resultados demonstraram que nossos isolados provenientes de humanos não

são especialmente associados a filogrupos patogênicos e sim a microrganismos integrantes da microbiota intestinal (Escobar- Paramo et al., 2004).

Quanto aos isolados de origem ambiental, aqueles determinados como pertencentes ao filogrupos B1 e D apresentaram perfis mais restritos de multirresistência, tendo a maioria dos isolados resistência a 4 antimicrobianos (72% e 67%, respectivamente), indicando uma menor patogenicidade dos mesmos ou uma menor exposição as drogas testadas (TABELA 5). Os poucos isolados classificados no filogrupo A, de origem ambiental, do mesmo modo apresentaram resistência a um menor número de antimicrobianos, tendo 86% deles resistência a 5 antimicrobianos (TABELA 5).

Estes dados também indicam um nível baixo de exposição prévia dos nossos isolados de origem ambiental aos antimicrobianos aqui avaliados, resultando em uma multirresistência a um número menor de antimicrobianos. Todavia, a resistência a antimicrobianos em cepas ambientais somada a presença de elementos genéticos móveis, pode ter papel importante na transmissão de resistência entre cepas bacterianas (D'Costa, Griffiths & Wright, 2007; Sommer & Dantas, 2011). Em um trabalho realizado com 220 *E. coli* de origem ambiental, aproximadamente 19% destas eram multirresistentes, sendo encontrada maior prevalência de resistência a antimicrobianos entre os isolados classificados nos filogrupos A e D. Os autores encontraram uma forte correlação entre a prevalência de integrons e o perfil de multirresistência (Pereira et al.,2013). Entre nossos isolados a multirresistência foi muito mais prevalente entre os isolados do filogrupo B1, como já citado.

O filogrupo B2 foi pouco encontrado no presente estudo, sendo que, entre os isolados de origem avícola, nenhum deste foi classificado neste filogrupo. Os isolados de origem humana do filotipo B2 apresentaram uma gama maior de multirresistência, tendo perfis de resistência variando de 4 a 10 antimicrobianos. Já os isolados de origem ambiental e suína deste filogrupo apresentaram perfis de resistência a 4 antimicrobianos (TABELA 5). Provavelmente estes resultados relacionam-se ao fato de que isolados pertencentes ao filogrupo B2 são mais associados a cepas enteropatogênicas, e nossos isolados, pelos perfis de susceptibilidade a antimicrobianos encontrados, não se enquadram neste padrão de virulência. (Le Gall et al., 2007).

Os isolados do presente estudo possivelmente são associados a microbiota comensal, já que *E.coli* pertencentes a filogrupos distintos podem, muitas vezes, colonizar o intestino humano e de animais em uma relação de comensalismo (Clermont et al., 2000; Escobar- Paramo et al., 2004). Ciccozzi et al., 2013, com base nos resultados de um trabalho aonde foram analisadas *E. coli* de origem humana e avícola, sustentam a hipótese de transmissão potencial, de clones multirresistentes de *E. coli*, das aves para os seres humanos, envolvendo, principalmente, os filogrupos tidos como comensais, A e B1, e não cepas dos filogrupos B2 e D.

4.4 Distribuição filogenética e produção de ESBLs

A produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) foi observada em 33% do total de isolados (157 isolados), estando presente em

três dos quatro conjuntos de isolados de diferentes origens analisados no presente trabalho. Dentre os isolados de origem ambiental a produção de ESBLs não foi constatada fenotipicamente, sendo mais frequente entre os isolados de origem humana e avícola (TABELA 6). O perfil susceptibilidade aos antimicrobianos já dava indícios destes resultados, pois as porcentagens de resistência a amoxicilina–ácido clavulânico e a piperacilina - tazobactam foi mais elevada em ambos os conjuntos, enquanto que a susceptibilidade ao aztreonam, imipenem, ceftazidima, cefotaxima e cefoxitina foi de 100% entre os isolados de origem ambiental (TABELA 3).

TABELA 6: Distribuição em filogrupos dos isolados de *E. coli* fenotipicamente positivos para ESBLs.

Filogrupo	ECH (n=16)	ECS (n=8)	ECAv (n=28)
A	43%	63%	18%
B1	19%	37%	79%
B2	19%	0	0
D	19%	0	3%
Total (n=52)	50%	18%	82%

ECH: *E. coli* de origem humana; ECS: *E.coli* de origem suína; ECAv: *E.coli* de origem avícola.

As *E. coli* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) compartilham a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração e aztreonam, mas são inibidas por ácido clavulânico. A produção destas penicilases está associada a genes que codificam beta-lactamases por mutações pontuais, alterando a configuração do aminoácido em torno do sítio ativo destas beta-lactamases, ampliando o espectro de agentes beta-lactâmicos susceptível a hidrólise por estas enzimas, sendo que já foram

publicados resultados demonstrando que *E.coli* isoladas de amostras clínicas portadoras de várias classes de beta-lactamases e metalobeta-lactamases (Paterson & Bonomo, 2005; Oteo et al., 2010).

No conjunto de isolados de origem avícola, mais de 80% destes apresentaram fenótipo positivo para a produção destas penicilinases (TABELA 6). Tal fato vai ao encontro dos resultados descritos nos perfis de multirresistência já citados deste grupo, pois um número maior de isolados apresentou resistência a uma gama maior dos 15 antimicrobianos testados, tendo destaque o percentual de resistência a cefotaxima (82%) e ao aztreonam (68%) (TABELA 3). Machado et al., 2008, também relataram uma alta porcentagem de *E. coli* produtoras de ESBLs (60%) isoladas a partir de carcaças de frango, o que corrobora a relação entre a origem avícola e este tipo de microrganismo. Já em um estudo realizado no Irã, foram analisadas 204 isolados de *E. coli* obtidos a partir de suabes da parte externa e da cavidade visceral de carcaças de frango, e destes, 15,2% eram positivas para produção de beta-lactamases, sendo uma porcentagem bem inferior aos nossos resultados, contudo, os autores consideraram que carcaças de frango poderiam ser meios potenciais para aquisição, transferência e manutenção de vários genes de virulência de agentes patogênicos, através da cadeia alimentar (Bagheri, Ghanbarpour & Alizade, 2014).

Quando comparado aos outros dois conjuntos, nossos isolados de origem suína apresentaram fenótipo positivo para estas penicilinases em menor grau, englobando somente 18% do total de isolados deste conjunto (TABELA 6). Este resultado reflete a maior susceptibilidade destes isolados as

cefalosporinas e a piperacilina – tazobactam (TABELA 3). Gonçalves et al, 2010, precisaram coletar 65 amostras de fezes frescas de suínos, sendo utilizado meio específico para isolamento de *E. coli* produtoras de penicilinases, para obterem 16 isolados (24,6%) positivos para produção de ESBLs, dados que também podem indicar uma baixa incidência deste microrganismos na população de suínos avaliada. Neste mesmo estudo, a produção de ESBLs foi associada a disseminação de genes de resistência, através de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e integrons. Em outro trabalho que, como o nosso, avaliou amostras de origem animal, isolados de *E. coli* multirresistentes a antimicrobianos, provenientes de infecções do trato urinário de cães, não apresentaram positividade para produção de beta-lactamases (Wagner, Gally & Argyle, 2014).

Dentre o conjunto de origem humana, houve positividade para produção de ESBLs em 50% dos isolados (TABELA 6), o que, provavelmente, também se relaciona a ampla gama de resistência observada nos antibiogramas, já que a porcentagem de resistência a amoxicilina – ácido clavulânico foi de 56%, a cefalosporinas ficou em torno dos 28% e a piperacilina – tazobactam foi de 37% (TABELA 3).

A exposição a antimicrobianos, muitas vezes utilizados em infecções urinárias, pode ter relação com nosso resultados, já que os isolados foram obtidos a partir de amostras de urina. Um estudo realizado em um pequeno povoado na Guiana Francesa, comparando dados de 2001, 2006 e 2010, observou que a prevalência de *E. coli* produtoras de ESBLs em 2010 foi de 5,3%, em 2006 de 8% e em 2001 de 3,2%. Foi constatado que o uso de

antimicrobianos na população em geral tinha diminuído no intervalo entre 2006 e 2010, principalmente para penicilinas e metronidazol, as duas drogas mais utilizados na região, levando os autores a deduzir, como em nosso estudo, que a exposição da população aos antimicrobianos provavelmente impacta sobre as taxas de disseminação destes microrganismos na comunidade. Pelos dados do estudo, os plasmídeos seriam primariamente envolvidos na dinâmica da disseminação de genes na microbiota intestinal desta mesma população (Woerther et al., 2013).

Outro estudo, realizado na Suécia, com dados coletados pelo sistema nacional de vigilância, ao longo de três anos, verificou um aumento no número de notificações de isolados de *E. coli* produtores de ESBLs, entre os anos de 2007, 2009 e 2011, principalmente isolados originados de amostras de urina. Também foi constatada uma diminuição da idade média dos indivíduos portadores destes isolados e alteração do perfil dos mesmos, pois, ao invés de pacientes hospitalizados, pessoas mais jovens, saudáveis e com histórico de freqüentes viagens a regiões endêmicas para *E. coli* produtoras de ESBLs foram aqueles mais associados a este tipo de microrganismo (Brolund et al., 2013).

Nossos resultados em relação ao conjunto de origem ambiental não coincidem com o estudo de Pereira et al. (2013), no qual amostras de um estuário foram analisadas e apresentaram resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos de modo relevante, sendo que, dos 75 isolados resistentes às penicilinas, 45% destes tinham o genótipo para produção de beta-lactameses, o que indicaria a presença destas penicilinas neste tipo de ambiente.

Talukdar et al., 2013, trabalhando com 233 *E. coli* isoladas de água da rede de abastecimento público, também encontraram uma porcentagem relevante (26%) de isolados fenotípicamente positivos para produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs).

Os isolados de origem humana, produtores destas penicilases, apresentaram uma distribuição filogenética mais homogênea. Foram classificados no filogrupo A 43% deles, tendo todos os outros filogrupos (B1, B2 e D) incidência de 19% cada (TABELA 6). Estes dados divergem dos resultados encontrados na literatura, onde o filogrupo B2, o mais associado a cepas enteropatogênicas, costuma ser o prevalente entre a cepas produtoras de ESBLs. Brolund et al., 2013, observaram que em 913 isolados de *E.coli* produtores de ESBLs, provenientes de amostras clínicas, o filogrupo B2 foi predominante (44,5%), seguido pelo filogrupo D (28,5%), enquanto que o filogrupo A englobou 18% dos isolados e o filogrupo B1 somente 9,5%.

Em outro estudo, realizado nos EUA, com isolados de *E. coli* de origem humana e produtores de ESBLs, o filogrupo B2 foi mais prevalente (50%), seguido do filogrupo D (25%), A (18%) e B1 (7%). Os autores constataram que os isolados eram portadores de muito genes de virulência, associados a produção de beta-lactamases e de resistência a antimicrobianos, sugerindo uma alta patogenicidade dos mesmos (Johnson et al., 2012).

Entre os isolados de origem avícola com esta característica, o filogrupo B1 foi o mais representativo, com 79% dos isolados, seguido pelo filogrupo A (18%) e pelo filogrupo B2 (3%), não sendo classificado no filogrupo D nenhum destes isolados. Dentre os isolados de origem suína, os filogrupo B2

e D não foram encontrados, englobando grande parte dos isolados o filogrupo A (63%) e o filogrupo B1 (37%) (TABELA 6). Levando em conta estes resultados, podemos inferir que, provavelmente, os isolados de origem avícola e suína fazem parte da microbiota comensal destes hospedeiros, sendo expostos a uma variedade maior de antimicrobianos, pois é sabido que a exposição continuada a antimicrobianos promove a seleção de isolados multirresistentes e, nos últimos anos, estudos tem alertado sobre a disseminação de isolados de *E.coli* produtores de ESBLs entre a microbiota intestinal de animais selvagens, domésticos e de criadouros (voltados para indústria alimentícia), podendo até representar um problema para a segurança alimentar (Costa et al., 2004, 2006, 2009).

Outra hipótese é a de que pela prevalência de isolados do filogrupo B2 em nosso estudo ter sido baixa (6%), a ocorrência de isolados classificados neste filogrupo e produtores de ESBLs, conseqüentemente, foi inferior em relação aos demais filotipos. Provavelmente, em um estudo com incidências equivalentes entre os filotipos, mais produtores de ESBLs poderiam ser encontrados dentro do filogrupo B2.

5. CONCLUSÕES

Neste estudo constatamos que os isolados de *E. coli* de diferentes origens demonstraram um considerável nível de resistência a ampicilina, tetraciclina, clorafenicol e sulfametoxazol – trimetoprim. Os isolados de origem humana e avícola foram aqueles que apresentaram os percentuais mais elevados de resistência a um número maior de antimicrobianos.

Os filogrupos A e B1 foram os mais encontrados entre os isolados analisados no presente estudo. A alta prevalência do filogrupo B1 no conjunto de origem ambiental pode estar relacionada ao ponto de coleta das amostras (região urbana) ou à capacidade de determinadas cepas associadas a este filogrupo de sobreviverem em habitats secundários, de forma saprófita.

Dentre os isolados dos filogrupos A e B1, foi encontrado um número maior de isolados multirresistentes aos antimicrobianos testados, sendo estes os filogrupos mais associados a multirresistência em nosso estudo.

A prevalência de isolados fenotipicamente positivos para beta-lactamases não foi elevada no total de isolados, porém, entre os isolados de aves e humanos ela foi relevante, o que sugere a exposição a beta-lactâmicos, como as cefalosporinas de terceira geração.

A produção de beta-lactamases de espectro estendido, entre os filogrupos, apresentou uma distribuição heterogênea, também concentrando-se

nos filogrupos A e B1, sendo restrita aos isolados de origem animal e humana.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para trabalhos futuros, seria interessante identificar nos isolados com perfil de multirresistência mais amplo, os determinantes genéticos presentes associados a produção de beta - lactamases e a outros mecanismos de resistência a antimicrobianos (sistema de bomba de efluxo, baixa expressão de porinas, etc.).

Realizar a análise do nível de similaridade genética dos isolados das distintas origens para verificar se estes conjuntos são heterogêneos ou não e se há relação clonal entre os mesmos.

Elevar o número de isolados analisados, coletando de uma variedade maior de fontes, visando englobar potencialmente os filogrupos com menor representatividade em nosso trabalho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, A.; SÁNCHEZ, P.; MARTÍNEZ, J.L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, v.3, n.1, p.1-9, 2001.

ALTEWEGG, M.; BOCKMUHL, J. *Escherichia e Shigella*. In: Topley & Wilson Microbiology and microbial infections. **Microbiology and Microbial Infection**., 9th ed., London: Arnold. 1998.

ALTERI, C.J. & MOBLEY, H.L. *Escherichia coli* physiology and metabolism dictates adaptation to diverse host microenvironments. **Current Opinion in Microbiology** v.15, p. 3–9, 2012.

AMINOV, R.I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Environmental Microbiology**, v.11, n.12, p.2970-2988, 2009.

ANDREMONT, A. Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance. **ASM News** v. 63, p. 601–607, 2003.

BAGHERI, M.; GHANBARPOUR, R. & ALIZADE, H. Shiga toxin and beta-lactamases genes in *Escherichia coli* phylotypes isolated from carcasses of broiler chickens slaughtered in Iran. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p.16–20, 2014.

BEN-JACOB, E. Bacterial self-organization: co-enhancement of complexification and adaptability in a dynamic environment. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A-Mathematical Physical and Engineering Sciences**, v. 361, p. 1283-1312, 2003.

BERGTHORSSON, U. & OCHMAN, H. Distribution of Chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, p. 6 -16, 1998.

BERTHE, T.; RATAJCZAK, M.; CLERMONT, O.; DENAMUR, E.; PETITA, F. Evidence for Coexistence of Distinct *Escherichia coli* Populations in Various Aquatic Environments and Their Survival in Estuary Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n. 15, p. 4684–4693, 2013.

BLANCH, A.R.; BELANCHE-MUÑOZ, L.; EDBON, J.; GANTZER, C.; LUCENA,

F.; OTTOSON, J.; KOURTIS, C.; IVERSEN, A.; MOCÉ, L.; SCHWARTZBROD, J.; SKRABER, S.; PAPAGEORGIOU, G.T.; TAYLOR, H.; WALLIS, J.; JOFRE, J. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.9, p. 5915–5926, 2006.

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G.; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science (New York, N.Y.)**, v. 277(5331), p. 1453–62, 1997.

BONACORSI, S. P.; CLERMONT, O.; TINSLEY, C.; LE GALL, I.; BEAUDOIN, J. C.; ELION, J.; BINGEN, E. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. **Infection and immunity**, v. 68(4), p. 2096–101, 2000.

BROLUND, A.; EDQUIST, P.J.; MAKITALO, B.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; SODERBLUM, T.; WISELL, K.T.; GISKE, C.G. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007-2011. **Clinical Microbiology Infection**. Published online: Oct 2013. doi: 10.1111/1469-0691.12413.

CANAL, N. Caracterização de resistência a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia coli* isolada de amostras de água da Lagoa dos Patos, RS. Abril, 2010. 98 f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. 2010.

CICCOZZI, M.; GIUFRE, M.; ACCOGLI, M.; LO PRESTI, A.; GRAZIANI, C.; CELLA, E.; CERQUETTI, M. Phylogenetic analysis of multidrug-resistant *Escherichia coli* clones isolated from humans and poultry. **New Microbiologica**, v. 36, p. 385-394, 2013

CLERMONT, O.; BONACORSI, S. & BINGEN, E. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.4555–4558, 2000.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 17th Informational Supplement**. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.

COSTA, D.; POETA, P.; BRINAS, L.; SÁENZ, Y.; RODRIGUES, J. & TORRES, C. Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 960–961, 2004.

COSTA, D.; POETA, P.; SÁENZ, Y.; VINUE, L.; ZARAZAGA, M.; BEZARES, B. R.; JOUINI, A.; RODRIGUES, J. & TORRES, C. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV

classes in faecal samples of wild animals in Portugal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 1311–1312, 2006.

COSTA, D.; VINUE, L.; POETA, P.; COELHO, A.C.; MATOS, M.; SÁENZ, Y.; SOMALO, S.; ZARAZAGA, M.; RODRIGUES, J. & TORRES, C. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. **Veterinary Microbiology**, v. 138, p. 339–344, 2009.

CROXEN, M. A. & FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 8, no. 1, p. 26–38, 2009.

DA SILVA, G. J. & MENDONÇA, N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. **Virulence**, v. 3(1), p. 18–28, 2012.

DAMBORG, P.; TOP, J.; HENDRICKX, A. P.; DAWSON, S.; WILLEMS, R. J.; GUARDABASSI, L. Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human infections. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, 2360–2365, 2009.

DESJARDINS, P.; PICARD, B.; KALTENBÖCK, B.; ELION, J., & DENAMUR, E. Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the clonal structure of the population: evidence from random amplified polymorphic DNA and restriction fragment - length polymorphism. **Journal of Molecular Evolution**, v.41, p.440–448, 1995.

DESMARAIS, T. R.; SOLO-GABRIELE, H. M.; PALMER, C. J. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.1165-1172, 2002.

DRUMMOND, V.O. & PERECMANIS, S. Enterotoxin genes and antimicrobial profile of *Escherichia coli* isolated from healthy swines in Distrito Federal, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.4, p.1005-1009, 2013.

DURIEZ P.; CLERMONT O.; BONACORSI S.; BINGEN E.; CHAVENTRE A.; ELION J.; PICARD B.; DENAMUR E. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. **Microbiology**, v.147, p.1671–1676, 2001.

D’COSTA, V.M.; GRIFFITHS, E. & WRIGHT, G.D. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n.5, p. 481-489, 2007.

ESCOBAR-PÁRAMO, P.; LE MENAC’H, A.; LE GALL, T.; AMORIN, C.; GOURIOU, S.; PICARD, B.; DENAMUR, E. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. **Environmental Microbiology**, v. 8, p.1975–1984, 2006.

ESCOBAR-PARAMO, P.; GRENET, K.; LE MENACH, A.; RODE, L.; SALGADO,

E.; AMORIN, C.; GOURIOU, S.; PICARD, B.; RAHIMY, M.C.; ANDREMONT, A.; DENAMUR, E.; RUIMY, R. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5698–5700, 2004.

FAJARDO, A. & MARTINEZ, J. L. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. **Current Opinion in Microbiology**, v., 11, p. 161–167, 2008.

FERNANDES, R.; AMADOR, P. & PRUDÊNCIO, C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 24(1), p. 7–17, 2013.

GANDOLFI - DECRISTOPHORIS, P.; PETRINI, O.; RUGGERI-BERNARDI, N. & SCHELLING, E. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in healthy companion animals living in nursing homes and in the community. **American Journal of Infection Control**, p. 1–5, 2013.

GARCIA-ARMISEN T. & SERVAIS P. Partitioning and fate of particle associated *E. coli* in river waters. **Water Environmental Research**, v. 81, p. 21–28, 2009.

GHANBARPOUR, R. & DANESHDOOST, S. Identification of Shiga toxin and intimin coding genes in *Escherichia coli* isolates from pigeons (*Columba livia*) in relation to phylotypes and antibiotic resistance patterns. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 307–312, 2012.

GIRARDEOU, J.P.; DALMASSO, A.; BERTIN, Y.; DUCKOT, C.; BORD, S.; LIVRELLI, V.; VERNOZY-ROZAND, C.; MARTIN, C. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, p. 6098-6107, 2005.

GONÇALVES, A.; TORRES, C.; SILVA, N.; CARNEIRO, C.; RADHOUANI, H.; COELHO, C.; ARAÚJO, C.; RODRIGUES, J.; VINUÉ, L.; SOMALO, S.; POETA, P.; IGREJAS, G. Genetic Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* Isolates of Pigs from a Portuguese Intensive Swine Farm. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n. 12, 2010.

GORDON, D.M. Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination. **Microbiology**, Canberra, v.147, p.1079-1085, 2001.

GORDON, D.M. The influence of ecological factors on the distribution and genetic structure of *Escherichia coli*. In *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F., et al. (eds). Washington, DC, USA: **American Society for Microbiology**, 2004.

GORDON, D. M. & COWLING, A. The distribution and genetic structure of

Escherichia coli in Australian vertebrates: host and geographic effects. **Microbiology**, v.149, p. 3575–3586, 2003.

GORDON, D.M.; CLERMONT, O.; TOLLEY, H.; DENAMUR, E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 2484–2496, 2008.

HAWKEY, P. M. & JONES, A. M. The changing epidemiology of resistance. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 64, Suppl.1, p. 3–10, 2009.

HERZER, P.J.; INOUYE, S.; INOUYE, M., & WHITTAM, T.S. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicity single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.172, p.6175–6181, 1990.

ISHII, S.; KSOLL, W. B.; HICKS, R. E.; SADOWSKY, M.J. Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from lake superior watersheds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 612-621, 2006.

JOHNSON, J.R.; DELAVARI, P.; KUSKOWSKI, M. & STELL, A.L. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. **Journal Infectious Diseases**, v. 183, p.78–88, 2001.

JOHNSON, J.R.; MANGES, A.R.; O'BRYAN, T.T.; RILEY, L.R. A disseminated multi-drug resistant clonal group of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of pyelonephritis. **Lancet**,v.359, p. 2249-2251, 2002.

JOHNSON, J. R.; URBAN, C.; WEISSMAN, S. J.; JORGENSEN, J. H.; LEWIS, J. S.; HANSEN, G.; EDELSTEIN, P. H.; ROBICSEK, A.; CLEARY, T.; ADACHI, J.; PATERSON, D.; QUINN, J.; HANSON, N.D.; JOHNSTON, B. D.; CLABOTS, C.; KUSKOWSKI, M. A. & THE AMERECUS INVESTIGATORS. Molecular Epidemiological Analysis of *Escherichia coli* Sequence Type ST131 (O25:H4) and *bla*CTX-M-15 among Extended Spectrum- β -Lactamase-Producing *E. coli* from the United States, 2000 to 2009. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2364–2370, 2012.

KOCZURA, R.; MOKRACKA, J.; ABŁOŃSKA, L.; GOZDECKA, E.; KUBEK, M.; KAZNOWSKI, A. Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. **Science of the Total Environment**, v.414, p. 680–685, 2012.

KANEENE, J.B.; MILLER, R.; SAYAH, R.; JOHNSON, Y.J.; GILLILAND, D.; GARDINER, J.C. Considerations when using discriminant function analysis of antimicrobial resistance profiles to identify sources of fecal contamination of surface water in Michigan. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.9, p.2878–2890, 2007.

LECLERC, H.; MOSSEL, D. A. A.; EDBERG, S.C.; STRUIJK, C.B. Advances in bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbiology water safety. **Annual Review of Microbiology**, v.55, p.201-234, 2001.

LECOINTRE, G.; RACHDI, L.; DARLU, P. & DENAMUR, E. *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. **Molecular Biology Evolution**, v.15, p. 1685–1695, 1998.

LE GALL, T.; CLERMONT, O.; GOURIOU, S.; PICARD, B.; NASSIF, X.; DENAMUR, E. & TENAILLON, O. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. **Molecular Biology Evolution**, v. 24, p. 2373-2384, 2007.

LIANG, Z.; HE, Z.; POWELL, C.A.; STOFFELLA, P.J. Survival of *Escherichia coli* in soil with modified microbial community composition. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p. 1591-1599, 2011.

LIVERMORE, D.M.; WINSTANLEY, T.G.; SHANNON, K.P. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, p.87-102, 2001.

LUO C.; WALK S.T.; GORDON D.M.; FELDGARDEN M.; TIEDJE J.M.; KONSTANTINIDIS K.T. Genome sequencing of environmental *Escherichia coli* expands understanding of the ecology and speciation of the model bacterial species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 108, p. 7200–7205, 2011.

MACÊDO, N.R.; MENEZES, C.P.L.; LAGE, A.P; RISTOW, L.E.; REIS, A. & GUEDES, R.M.C. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1117-1123, 2007.

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

MATSUMURA, Y.; YAMAMOTO, M.; NAGAO, M.; HOTTA, G.; MATSUSHIMA, A.; ITO, Y.; TAKAKURA, S. & ICHIYAMA, S. Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and DST405 clonal groups among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, p. 2612-2620, 2012.

MISBAH, S.; HASSAN, H.; YUSOF, M. Y.; HANIFAH, Y. A.; ABUBAKAR, S. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. **Singapore Medical Journal**, v.46, n.9, p.461-464, 2005.

MOREIRA S.; BROWN A.; HA R.; ISERHOFF K.; YIM M.; YANG J.; LIAO B.; PSZCZOLKO E.; QIN W.; LEUNG K.T. Persistence of *Escherichia coli* in freshwater periphyton: biofilm-forming capacity as a selective advantage. **FEMS Microbiology Ecologic.**, v. 79, p. 608–618, 2012.

OCHMAN, H. & SELANDER. R.K. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. **Journal Bacteriology**, v. 157, p.690–693, 1984.

OLIVER, D.M.; HAYGARTH, P.M.; CLEGG, C.D.; HEATHWAITE, L. Differential *E coli* dieoff patterns associated with agricultural matrices. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 5710-5716, 2006.

OTEO, J.; PEREZ-VAZQUEZ M.; CAMPOS J. Extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, p. 320–326, 2010.

PACHEPSKY Y.A. & SHELTON D.R. *Escherichia coli* and fecal coliforms in freshwater and estuarine sediments. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, p. 1067–1110, 2011.

PATERSON, D.L. & BONOMO, R.A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p. 657–686, 2005.

PEREIRA A.; SANTOS A.; TACÃO M.; ALVES A.; HENRIQUES I.; CORREIA A. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary (Portugal). **Science of the Total Environment**, v. 461–462, p. 65–71, 2013.

PICÃO, R.C. & GALES, A.C. β -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: Pesadelo ou só Imaginação? **Prática Hospitalar**, n.49, p. 79-84, 2007.

POWER, M. L.; LITTLEFIELD-WYER, J.; GORDON, D. M.; VEAL, D. A. & SLADE, M. B. Phenotypic and genotypic characterization of encapsulated *Escherichia coli* isolated from blooms in two Australian lakes. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 631–640, 2005.

PUPO, G.M.; KARAOLIS, D.K.R.; LAN, R. & REEVES, P.R. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. **Infection and Immunity**, v. 65, p.2685–2692,1997.

RATAJCZAK M.; LAROCHE E.; BERTHE T.; CLERMONT O.; PAWLAK B.; DENAMUR E.; PETIT F. Influence of hydrological conditions on the *Escherichia coli* population structure in the water of a creek on a rural watershed. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 222, 2010.

ROZEN Y. & BELKIN S. Survival of enteric bacteria in seawater. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 513–529, 2001.

RYBARIKOVA, J.; DOLEJSKA, M.; MATERNA, D.; LITERAK, I.; CIZEK, A. Phenotypic and genotypic characteristics of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from symbiotic flies, cattle and sympatric insectivorous house martins from a farm in the Czech Republic (2006-2007). **Research in Veterinary Science**, v.89, p. 179–183, 2010.

SABATÉ, M.; MORENO, E.; PÉREZ, T.; ANDREU, A. & PRATS G. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 9, p. 880–886, 2006.

SAVICHTCHEVA, O. & OKABE, S. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water research**, v. 40, n.13, p. 2463–76, 2006.

SELANDER, R.K.; CAUGANT, D.A., & WHITTAM, T.S. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. In *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium, Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Magasanik, B., Low, K.B., Schaechter, M., and Umberger, H.E. (eds). Washington, DC, USA: **American Society of Microbiology**, p. 1625–1648, 1987.

SELANDER, R. K.; CAUGANT D. A.; OCHMAN H.; MUSSSER J. M.; GILMOUR M. N. & WHITTAM T. S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p.873–884, 1986.

SKURNIK D.; BONNET D.; BERNÈDE-BAUDUIN C.; MICHEL R.; GUETTE C.; BECKER J.M.; BALAIRE C.; CHAU F.; MOHLER J.; JARLIER V.; BOUTIN J.P.; MOREAU B.; GUILLEMOT D.; DENAMUR E.; ANDREMONT A.; RUIMY R. Characteristics of human intestinal *Escherichia coli* with changing environments. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 2132–2137, 2008.

SMET A.; MARTEL A.; PERSOONS D., *et.al.* Characterization of extended-spectrum betalactamases produced by *Escherichia coli* isolated from hospitalized and nonhospitalized patients: Emergence of CTX-M-15-producing strains causing urinary tract infections. **Microbial Drug Resistance**, v. 16, p. 129-134, 2010.

SOLO-GABRIELE, H. M.; WOLFERT, M. A.; DESMARAIS, T.R.; PALMER, C.J. Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 230-237, 2000.

SOMMER, M.; DANTAS, G. 'Antibiotics and the resistant microbiome'. **Current**

Opinion in Microbiology, v. 14, no. 5, p. 556-563, 2011.

TALUKDAR, P.K.; RAHMAN, M.; NABI, A.; ISLAM, Z.; *et al.* Antimicrobial Resistance, Virulence Factors and Genetic Diversity of *Escherichia coli* Isolates from Household Water Supply in Dhaka, Bangladesh. **Plos One**, v. 8 (4), e61090, 2013.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 207–217, 2010.

TIBA, M.R.; NOGUEIRA, G.P.; LEITE, D.S. Estudo dos fatores de virulência associados a formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* isoladas de pacientes com cistite. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 58-62, 2009.

TOPP, E.; WELSH, M.; TIEN, Y.; DANG, A.; LAZAROVITS, G.; CONN, K., & ZHU, H. Strain-dependent variability in growth and survival of *Escherichia coli* in agricultural soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 44, p.303–308, 2003.

VAN DEN BOGAARD A.E. & STOBBERINGH EE. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p. 327–335, 2000.

VAN ELSAS, J.D.; SEMENOV A.V.; COSTA R.; TREVORS J.T. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. **ISME Journal**, v. 5, p.173–183, 2010.

WAGNER, S.; GALLY, D. L.; ARGYLE, S. A. Multidrug-resistant *Escherichia coli* from canine urinary tract infections tend to have commensal phylotypes, lower prevalence of virulence determinants and ampC-replicons. **Veterinary Microbiology**, v.169, p.171–178, 2014.

WALK, S.T.; ALM, E.W.; CALHOUN, L.M.; MLADONICKY, J.M. & WHITTAM, T.S. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. **Environmental Microbiology**, v. 9, p.2274–2288, 2007.

WELCH, R. A. The Genus *Escherichia*. In: DWORKIN M., FALKOW S., ROSENBERG E., SCHLEIFER K.H., STACKEBRANDT E. **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria**, Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. New York, USA : Springer Science, Setembro, 2006. pág. 60 – 71.

WIRTH, T.; FALUSH, D.; LAN, R.; COLLES, F.; MENSA, P.; WIELER, L.H., *et al.* Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. **Molecular Microbiology**, v. 60, p.1136–1151, 2006.

WOERTHER, P. L.; ANGEBAULT, C.; JACQUIER, H.; CLERMONT, O.; EL MNIAI, A.; MOREAU, B.; DJOSSOU, F.; PEROZ, G.; CATZEFLIS, F.;

DENAMUR, E.; ANDREMONTB, A. Characterization of Fecal Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in a Remote Community during a Long Time Period. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 5060–5066, 2013.

WRIGHT G.D. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic?. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 589–594, 2010.

YAN-YAN, H.; JIA-CHANG, C.; HONG-WEI, Z.; DAN, C.; XIAO-FEI, Z.; WEI-LIANG, C.; RONG, Z.; GONG-XIANG, C. Molecular Typing of CTX-M-producing *Escherichia coli* Isolated from Environmental Water, Swine Feces, Healthy Human Specimens and Human Patients. **Applied and Environmental Microbiology**, doi:10.1128/AEM.01740-13, 2013.

YINGST, S.L.; SAAD, M. D.; FELT, S.A. Classifyng *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.8, p.1297-1298, 2006.

8. APÊNDICES

8.1 Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose

8.1.1 Gel agarose 1%

Agarose	1g
Tampão TAE1x	100mL

8.1.2 Tampão TAE 1X

Tampão TAE 50X	20 mL
Água destilada	1000mL

8.1.3 Tampão TAE 50X

Tris- HCl	242,0 g
Acido Acético Glacial	57,1mL
EDTA 0,5M pH8,0	100mL
Água destilada	1000mL