

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* RESISTENTE A
ANTIMICROBIANOS EM DIFERENTES SÍTIOS CORPORAIS EM
UMA POPULAÇÃO DIVERSA DE GATOS SAUDÁVEIS**

**Marly Cristina Pinto Wanderley
Médica Veterinária**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* RESISTENTE A
ANTIMICROBIANOS EM DIFERENTES SÍTIOS CORPORAIS EM
UMA POPULAÇÃO DIVERSA DE GATOS SAUDÁVEIS**

Marly Cristina Pinto Wanderley

Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Microbiologia
Agropecuária

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARLY CRISTINA PINTO WANDERLEY – Nascida em 11 de junho de 1961, em São Paulo –SP. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV– UNESP), Campus de Jaboticabal, em 1983. Especializou-se em Biologia pela Universidade de Franca (UNIFRAM), em 1986. Iniciou Mestrado em Microbiologia Agropecuária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV-UNESP), Campus de Jaboticabal, em 2008 e concluiu em 2010. Iniciou Doutorado pela mesma Faculdade em 2011 e concluiu em 2015. Trabalha em clínica e cirurgia de pequenos animais, na cidade de Ituverava desde 1985. Foi docente da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ituverava (FFCL-FEI), onde ministrou a disciplina de Biologia de 1985 a 2002. É docente do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade Dr. Francisco Maeda de Ituverava (FAFRAM-FEI) desde 2008, onde atualmente ministra as disciplinas de Animais Selvagens, Doenças Infecciosas dos Animais domésticos, Epidemiologia Veterinária e Saneamento Ambiental Aplicado e Imunologia. Membro do Comitê de Ética em Pesquisa com o Uso de Animais (CEUA-FAFRAM) desde 2008. Supervisiona Estágio Curricular de Conclusão de Curso na Área de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais.

Se aceitares, meu filho, minhas palavras
e conservares os meus preceitos,
dando ouvidos à sabedoria,
e inclinando o teu coração ao entendimento;
se invocares a inteligência
e chamares o conhecimento;
se o procurares como o dinheiro
e o buscares como um tesouro;
então entenderás o temor de Iahweh
e encontrarás o conhecimento de Deus.
Pois é Iahweh quem dá a sabedoria;
de sua boca procedem o conhecimento e o entendimento.
Ele guarda para os retos a sensatez,
é escudo para os que andam na integridade.
Ele vigia as sendas do direito,
e guarda os caminhos dos seus fiéis.
Então entenderás a justiça e o direito,
a retidão e todos os caminhos da felicidade;
porque virá a sabedoria ao teu coração
e terás gosto no conhecimento;
a reflexão te guardará,
e o entendimento te protegerá.

PROVÉRBIOS 2, 1-11
BÍBLIA DE JERUSALÉM

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Humberto (in memorian) e Marly, pois com vocês aprendi a maior de todas as lições: o amor.

Filhos, Odair Júnior, Mariana e Daniel, pois através de vocês minha vida ficou plena de significado.

Netos, Isabella e Gabriel, pois vocês representam a alegria, a esperança, a renovação de minhas forças e fê. Futuros netos...se porventura Deus, em sua imensa bondade, ainda me conceder.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Moacir Marin, porque durante esse tempo de convívio se tornou uma referência profissional e humana.

AGRADECIMENTOS

Sobre todas as coisas, agradeço a Deus, porque Dele tudo procede. Nele existo, me movo e sou.

Ao meu orientador, prof. Dr. José Moacir Marin, pela sabedoria, paciência, generosidade e excelente orientação.

À minha mãe, por todo apoio, cumplicidade, força e orações.

Aos meus amados filhos, Odair Júnior e esposa Aneliza, Mariana e esposo Diego e ao Daniel, pelo incentivo, apoio, carinho e por perdoar minhas ausências.

À tia Marisa, por seu bom humor constante e contagiante, por sua imensa dedicação, valiosa colaboração nas coletas e em várias outras etapas do trabalho.

À Regina Helena Nogueira Couto, pelas preciosas sugestões, palavras de incentivo, apoio e orações.

Ao Antônio José Paula Costa, pelas valiosas e constantes palavras de incentivo, apoio e orações, além da colaboração com o trabalho.

Aos meus queridos, irmão e cunhada, Gilberto Pinto Wanderley e Valdiléia Maria de Paula Wanderley, pelo apoio em todos os momentos de minha vida.

Ao Ezequias Patrocínio Rosa, pela ajuda com as coletas e, em várias outras etapas do trabalho, sua colaboração foi imprescindível.

À Livia Gerbasi Beraldo, pela preciosa colaboração com as análises filogenéticas.

À Rosângela Jomori Bonichelli, pelo auxílio com a análise estatística.

À Maria Emília Nadaletto Bonifácio da Silva, pelos esclarecimentos e colaboração.

À Vânia Costa, pela amizade, carinho, disponibilidade e contribuições com o trabalho.

À Juliana Maria Avanci Agostinho, pela colaboração no trabalho, amizade, e por fazer parte da equipe Arca de Noé.

Ao Cleber Jacob Silva de Paula, pela indicação, incentivo e apoio na clínica.

À Carla de Souza Morandin de Paula, pela valiosa ajuda na clínica.

À Sara Felicia Assaf Abud Abdala, pelo carinho, apoio e colaboração.

À Milene, por estar sempre disposta a ajudar, pelo incentivo e apoio.

À Aline Gomes Silva, pela valiosa colaboração no trabalho e sugestões.

À Ineida Ângela Maciel, pela amizade, colaboração e apoio, sem a sua ajuda, pouco poderia fazer.

À Regiane Teixeira, pela valiosa contribuição com o trabalho.

À Edna, secretária do Departamento de Microbiologia da UNESP-Jaboticabal, por toda a ajuda, amizade e boa vontade constantes.

À Tânia Marques da Silva, técnica do Laboratório de Genética do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Estomatologia da USP, pela disponibilidade, ajuda e amizade durante todo o desenvolvimento do trabalho.

À Cynthia Silva de Paula, coordenadora do CAPS Viver Ituverava, pela gentileza em disponibilizar dados sobre a saúde do Município de Ituverava.

À Maira Balatore de Oliveira, diretora técnica do NGA e CSII, pelos dados sobre consumo de antimicrobianos nos Postos de Saúde de Ituverava, gentilmente fornecidos para este trabalho.

À Isabel Aparecida Costa, funcionária da Santa Casa de Misericórdia de Ituverava, pela gentileza em disponibilizar dados sobre o consumo de antimicrobianos deste hospital.

Ao Anderson Durant, pela compilação dos dados sobre consumo de antimicrobianos na Saúde Pública de Ituverava.

À FAFRAM – Faculdade Dr. Francisco Maeda de Ituverava, por disponibilizar seus laboratórios para a realização de partes da pesquisa.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, sempre atenciosos e prestativos.

Aos docentes do Programa de Microbiologia Agropecuária, pelos ensinamentos.

À UNESP - Jaboticabal pelo curso.

Por último, mas nem por isso menos importante:

Aos gatos e seus tutores, sem vocês esse trabalho não existiria! Meu muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Testes fenotípicos para identificação de ESBL. A) ESBL E-test; B) teste do disco combinado; C) teste da aproximação de discos. CTX: cefotaxima; CLA: ácido clavulânico; CAZ: ceftazidima; CFT: ceftiofur; AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; CPM: cefepime. Fonte: Silva; Lincopan, 2012.	31
Figura 2	Áreas geográficas que delimitam as três populações de gatos caracterizadas segundo a distância com centros de saúde humana (CSH –círculo vermelho), centros de saúde veterinária (CSV-círculo verde), sem proximidade com esses locais (SMP- população sem proximidade), região de intersecção entre os centros de saúde humana e veterinária (círculo preto- animais não coletados).	39
Figura 3	Mapa da Cidade de Ituverava- SP, onde são destacadas as unidades de saúde humana (CSH-pontos vermelhos), unidades de saúde veterinária (CSV-pontos verdes) e a distribuição dos 65 gatos coletados, por endereço (pontos azuis).	40
Figura 4	Coleta da boca de gato doméstico através da utilização de swab estéril	41
Figura 5	Material utilizado para coleta e manutenção das amostras até a semeadura.	41
Figura 6	(A) Meio agar Hicrome semeado evidenciando as colônias de <i>E. coli</i> (verdes) (à direita); (B) Meio MacConkey, onde são visualizadas colônias róseas (lactoses positivas), de <i>E. coli</i> . (à esquerda).	43
Figura 7	A) Meio de Rugai modificado em inóculo inoculação; B) Amostras positivas para <i>E. coli</i> sacarose positiva (à direita) e sacarose negativa (à esquerda).	43
Figura 8	Identificação bioquímica de Enterobactérias contendo provas de Indol, LTD, sacarose, glicose, produção de gás, urease, H ₂ S, lisina e motilidade. Fonte: Cecon- Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico.	44
Figura 9	Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético de cepas de <i>E. coli</i> , utilizando os resultados da PCR dos genes <i>chuaA</i> , <i>yjaA</i> e <i>TSPE4</i> .	46
Figura 10	Distribuição dos sexos dos gatos coletados em Ituverava-SP, 2014.	48
Figura 11	Distribuição, segundo a faixa etária, dos gatos coletados em Ituverava-SP, 2014.	48
Figura 12	Distribuição dos gatos coletados quanto à convivência com outros gatos e/ou outras espécies, em Ituverava-SP, 2014.	49

Figura 13	Distribuição das frequências de isolados de <i>E. coli</i> por sítio corporal dos gatos pesquisados, em Ituverava-SP, 2014	50
Figura 14	Sumariza o número de gatos e isolados de <i>E. coli</i> nas populações CSH (23 gatos, 87 isolados), CSV (17 gatos, 59 isolados) e SMP (25 gatos 85 isolados) em Ituverava-SP, 2014. Os círculos mostram a área definida (raio 300m) como proximidade a centros de saúde humana (em vermelho) e proximidade a centros de saúde veterinária (em verde). Fonte: Google Mapas (com modificações).	51
Figura 15	Análise de agrupamento hierárquico evidenciando a formação de grupos de antimicrobianos quanto à similaridade de suas frequências de resistência entre os isolados de <i>E. coli</i> de gatos domésticos, em Ituverava-SP, 2014.	54
Figura 16	Análise de agrupamento não hierárquico (K-means) evidenciando as respostas de resistências dos grupos de antimicrobianos para os isolados de <i>Escherichia coli</i> dos gatos domésticos, em função da população de origem (CSH-Centro de Saúde Humana; CSV-Centro de Saúde Animal e SMP-Sem Proximidade com esses locais), em Ituverava-SP, 2014.	55
Figura 17	Representação da prevalência da resistência de cada antimicrobiano testado em relação aos sítios corporais de gatos, em Ituverava –SP, 2014. * amoxicilina-ácido clavulânico (AMC), amicacina (AMI), ampicilina (AMP), aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), cefalotina (CFL), cefoxitina (CFO), cefazolina (CFZ) cefepime (CPM), ceftriaxona (CRO), cotrimoxazol (SUT), gentamicina (GEN), ácido nalidíxico (NAL), nitrofurantoína (NIT), norfloxacin (NOR), tetraciclina (TET).	56
Figura 18	Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) Triplex. Canaletas 1; 21; 41: marcador de peso molecular, canaleta 2; 22; 42: C+ =controle positivo genes <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> e <i>TspE4C2</i> , canaleta 3: C- = controle negativo, canaletas 4, 5, 7, 8, 17, 18, 32, 33, 36, 54, 57: grupo D; canaletas 9, 11, 13, 14, 16, 19, 20, 23, 26, 28, 29, 30, 31, 34, 39, 40, 43, 46, 51, 52, 53, 56: grupo B2; canaleta 49: grupo B1; canaletas 6, 10, 12, 24, 25, 27, 35, 37, 38, 44, 45, 47, 48, 50, 55: grupo A.	60
Figura 19	Representação das cepas (n=191) suscetíveis e resistentes de <i>E. coli</i> em cada um dos filogrupos (A, B1, B2 e D), nos gatos pesquisados em Ituverava-SP, 2014.	62
Figura 20	Representa os agentes antimicrobianos consumidos nos Postos de Saúde e Hospital Público (Santa Casa de Misericórdia de Ituverava) em um período de 12 meses (2014).	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos isolados pan-susceptíveis de <i>E. coli</i> (n=89) em relação aos sítios corporais dos gatos pesquisados, segundo população de origem, em Ituverava-SP, 2014.	52
Tabela 2	Percentuais de resistência antimicrobiana em cepas de <i>E. coli</i> isoladas de gatos, segundo suas populações de origem, em Ituverava-SP, 2014.	53
Tabela 3	Percentuais de resistências de <i>E. coli</i> isoladas de diferentes sítios corporais de gatos, em Ituverava-SP, 2014.	57
Tabela 4	Distribuição do perfil de resistência antimicrobiana de cepas de <i>E. coli</i> isoladas de diversos sítios corporais de gatos, segundo sua população de origem, em Ituverava-SP, 2014.	58
Tabela 5	Distribuições de resistências às múltiplas drogas (MDR) entre as cepas de <i>E. coli</i> isoladas de gatos, em Ituverava-SP, 2014, segundo as populações de origem.	59
Tabela 6	Distribuição dos grupos filogenéticos, mostrando os números absolutos e os percentuais de resistência de isolados de <i>E. coli</i> dentro de cada grupo e população de gatos, em Ituverava, 2014.	61
Tabela 7	Distribuição dos grupos filogenéticos (A, B ₁ , B ₂ e D) das cepas de <i>E. coli</i> em relação aos diversos sítios corporais e frequências de resistência de cada grupo em cada sítio corporal de gatos, em Ituverava-SP, 2014	64
Tabela 8	Consumo de agentes antimicrobianos (mg) em um período de 12 meses (2014) nas unidades de Saúde Pública Humana, em Ituverava-SP.	66

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	Xii
ABSTRACT.....	Xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Gatos.....	4
2.1.1 Histórico de domesticação.....	4
2.1.2 Principais aspectos fisiológicos e etológicos.....	5
2.1.2.1 Hábitos alimentares.....	5
2.1.2.2 Estrutura social, territorialismo e área de vida.....	6
2.1.2.3 Microbiota anfibiônica de gatos domésticos.....	8
2.1.2.3.1 Microbiota da pele de gatos domésticos.....	8
2.1.2.3.2 Microbiota da boca de gatos domésticos.....	9
2.1.2.3.3 Microbiota da genitália externa de gatos domésticos.....	10
2.1.2.3.4 Microbiota intestinal de gatos domésticos.....	11
2.2 A relação entre humanos e gatos; benefícios desta relação.....	12
2.2.1 Os gatos domésticos na sociedade humana atualmente: características das populações de gatos e de seus tutores.....	13
2.3 <i>Escherichia coli</i>	15
2.3.1 Tipos de <i>E. coli</i> e caracterização epidemiológica.....	16
2.3.1.1 <i>E. coli</i> comensal e a microbiota.....	16
2.3.1.2 <i>E. coli</i> patogênica intestinal ou diarreiogênica.....	17
2.3.1.2.1 <i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC)	17
2.3.1.2.2 <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	18
2.3.1.2.3 <i>E. coli</i> shigatoxigênica (STEC)	18
2.3.1.2.4 <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	19
2.3.1.2.5 <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	19
2.3.1.2.6 <i>E. coli</i> difusoaderente (DAEC)	20
2.3.2 <i>E. coli</i> patogênica extraintestinal (ExPEC)	20
2.4 Análise filogenética em <i>E. coli</i>	20
2.5 Antimicrobianos: definição e usos gerais.....	22
2.5.1 Linha do tempo da descoberta dos antimicrobianos.....	22
2.5.2 Principais classes de antimicrobianos, mecanismos de ação e de resistência antimicrobiana.....	23
2.5.2.1 β -lactâmicos.....	24
2.5.2.2 Aminoglicosídeos.....	24
2.5.2.3 Macrolídeos.....	25
2.5.2.4 Cloranfenicol.....	25
2.5.2.5 Tetraciclinas.....	25
2.5.2.6 Lincosaminas.....	26

2.5.2.7	Quinolonas e fluorquinolonas.....	26
2.5.2.8	Sulfonamidas.....	26
2.5.3	Resistência antimicrobiana: considerações sobre suas origens.....	27
2.5.4	Principais mecanismos de resistência antimicrobiana.....	28
2.5.5	Betalactamases; resistência ampliada aos betalactâmicos – <i>ESBL</i> (<i>Extended Spectrum B-lactamase</i>) e detecção fenotípica de cepas <i>ESBL</i>	29
2.5.6	Epidemiologia da resistência antimicrobiana.....	31
2.6	Resistência antimicrobiana em cepas de <i>E. coli</i> isoladas de animais de companhia.....	32
2.7	Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções por <i>E. coli</i> resistente a antimicrobianos na saúde humana.....	33
2.8	Resistência antimicrobiana associada às unidades de assistência à saúde humana e a contaminação ambiental	35
2.9	Resistência antimicrobiana associada às unidades de assistência à saúde veterinária e a contaminação ambiental.....	36
3.	OBJETIVOS.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1	Breve caracterização da localidade de estudo.....	38
4.2	Coleta de amostras e isolamento de <i>Escherichia coli</i>	38
4.3	Identificação de <i>Escherichia coli</i>	41
4.4	Testes de susceptibilidade antimicrobiana.....	44
4.5	Detecção do Fenótipo de betalactamases de espectro estendido – <i>ESBL</i> (<i>Extended Spectrum Betalactamase</i>).....	45
4.6	Extração de DNA.....	45
4.7	Determinação do grupo filogenético.....	46
4.8	Consumo de antimicrobianos na saúde humana, no Município de Ituverava, em 2014.....	46
4.9	Análise estatística.....	47
5.	RESULTADOS.....	48
6.	DISCUSSÃO.....	67
7.	CONCLUSÃO.....	80
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* RESISTENTE A ANTIMICROBIANOS EM DIFERENTES SÍTIOS CORPORAIS EM UMA POPULAÇÃO DIVERSA DE GATOS SAUDÁVEIS

RESUMO - Animais de estimação e humanos têm contato muito próximo, o que favorece o intercâmbio de micro-organismos de suas microbiotas, como, por exemplo, de *Escherichia coli* (*E. coli*), que é prevalente como simbiote na microbiota de humanos e animais. Paradoxalmente, também é reconhecida como micro-organismo com alto impacto clínico, devido à elevada ocorrência de cepas resistentes às múltiplas drogas. O alto consumo de antimicrobianos, observado tanto na medicina humana, quanto na veterinária, representa forte pressão de seleção também em bactérias da microbiota. Desta forma, o presente estudo investiga a prevalência da resistência antimicrobiana e analisa a filogenia de cepas de *E. coli* isoladas de abdômen/dorso, boca, genitália externa e reto de gatos saudáveis, relacionando-as com sua população de origem. A proximidade da residência do tutor do gato em relação a locais onde o uso de agentes antimicrobianos é rotineiro foi usada como critério para a formação de três populações, constituídas da seguinte forma: por animais cujos tutores residem próximos a hospitais ou postos de saúde humana (CSH); próximos às clínicas veterinárias (CSV) e sem proximidade com esses locais (SMP). Foram coletadas 325 amostras a partir de 65 gatos, das quais foram obtidas 231 cepas de *E. coli*, provenientes de todos os sítios corporais pesquisados. O reto originou a maioria dos isolados susceptíveis. A população CSH exibiu maiores frequências de resistência à ampicilina, cefazolina e cefalotina, assim como a maioria dos fenótipos de resistência às múltiplas drogas (MDR), a população CSV foi mais resistente ao cotrimoxazol. Maior similaridade de resistência foi observada entre cepas isoladas do reto e genitália externa e, entre as isoladas do abdômen/dorso e boca. Fenótipo *ESBL* (*Extended Spectrum Betalactamases* - Beta lactamases de espectro ampliado) ocorreu em duas cepas (0,88%). Classificação filogenética, realizada por Triplex PCR, em 191 cepas, revelou presença de todos os grupos filogenéticos pesquisados (A, B₁, B₂ e D), a maioria oriunda do grupo A (49,7%) em todas as populações; o grupo B₂ ocorreu em 36,1% dos isolados, enquanto os grupos B₁ e D em 4,9% e 9,9% respectivamente. As maiores prevalências de resistência nos grupos filogenéticos, segundo a população de origem foram: grupos A e D, população CSH (64,3 e 70,0%, respectivamente); grupo B₂, populações CSV e SMP (69,5 e 47,6%, respectivamente); grupo B₁, apresentou 100% de resistência nas cepas CSH, 50% na SMP e 20% na CSV (20%). Entre os isolados do reto foram observados os filogrupos A (44%), B₁ (4,7%), B₂ (36,2%) e D (14,9%); os isolados do abdômen/dorso foram exclusivamente do grupo A, enquanto os da genitália externa exibiram maiores prevalências dos grupos B₂ (52,6%) e A (42%), não ocorrendo cepas do grupo D. As provenientes da boca se distribuíram somente entre os grupos A (76,9%) e B₂ (23,1%). *E. coli* resistente a antimicrobianos foi isolada em todos os sítios corporais investigados nas três populações, o que aumenta o risco de disseminação de cepas MDR entre humanos.

Palavras chave: *ESBL* (Resistência estendida aos betalactâmicos), multirresistência, filogenia, saúde humana, saúde animal.

OCURRENCE OF ANTIMICROBIAL RESISTANT *Escherichia Coli* FROM DIFFERENT BODY SITES IN DIVERSE HEALTHY CAT POPULATIONS.

SUMMARY – Pets and humans have close contact, allowing the exchange of micro-organisms of their microbiota as *Escherichia coli* (*E. coli*), which is prevalent as a simbiote of the human and animal microbiota. Paradoxally, it is also recognized as a high clinic impact, due to a high occurrence of multiple drugs resistant strains. The high usage of antimicrobials agents, observed in the human medicine, as well as in the veterinary medicine, represents a high selection pressure in microbiota bacteria. This way, the present study investigates the prevalence of the antimicrobial resistance and analyzes the phylogenetic origin of *E. coli* isolated from abdomen/back, mouth, outer genitalia and rectum of healthy cats, relating these data with the original population. The proximity of the cat tutor's residence in relation to places where the use of antimicrobial agents is routine was used as a criterion for the formation of three groups such as follows: constituted by animals that live close to hospitals and Health Human Care (CSH); close to veterinary clinics (CSV) and without proximity to these places (SMP). 325 samples were collected from 65 cats, which were obtained 231 cepas of *E. coli* originated from all the researched body sites. The rectum originated most of the susceptible isolated. The CSH population showed greater resistance frequency to ampicillin, cefazoline and cephalotin as well as most of multiple resistance drugs (MDR) phenotype, the CSV population was more resistant to the cotrimoxazol. A greater resistance similarity was observed in isolated cepas of the rectum and outer genitalia, and between the abdomen/back and mouth isolates. The phenotype *ESBL* (Extended Spectrum Betalactamase) occurred in two strains (0,88%). The phylogenetic classification, performed by Triplex PCR, in 191 strains, showed the presence of all the researched phylogenetic groups (A, B₁, B₂, and D), the majority originated from group A (49,7%) in all the populations; the B₂ group occurred in 36,1% of the isolated, while the B₁ and D groups in 4,9% and 9,9% respectively. The majority of the resistance prevalences in the phylogenetic groups, according to the origin population were A and D groups, CSH population (64,3 and 70,0%, respectively); B₂ group, CSV and SMP populations (69,6 and 47,6%, respectively); B₁ group presented 100% of resistance in the CSH strains, 50% in SMP and 20% in CSV. Among the isolated, were observed the phylogroups A (44%), B₁ (4,7%), B₂ (36,2%) and D (14,9%); the abdomen/back isolates were exclusively in group A. While the ones from the outer genitalia showed greater prevalence of the groups B₂ (52,6%) and A (42%), and no strain occurred in group D. The ones originated in the mouth were distributed only between the groups A (76,9%) and B₂ (23,1%). The antimicrobial resistant *E. coli* was isolated in all the body sites researched in the three populations, which increases the dissemination risk of MDR strains among humans.

Key Words: *ESBL* (Extended spectrum betalactamase), multiresistance, phylogeny, human health, animal health).

1. INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos cães, gatos e humanos compartilham o mesmo ambiente, porém, nunca tão intensamente quanto o fazem agora. Atualmente, no Brasil, apesar de ainda predominarem os cães como animais de estimação, a preferência por gatos aumenta cada vez mais, pois suas características são mais adequadas ao estilo de vida moderno: podem ser criados em espaços menores e demandam menos tempo de seus tutores em seus cuidados, já que exibem um comportamento mais independente em relação aos cães.

A relação entre humanos e animais, estabelecida desde os primórdios da humanidade, começou a se intensificar a partir da domesticação destes. O desenvolvimento da agricultura permitiu que os humanos se fixassem à terra, substituindo gradualmente sua condição de caçador-coletor nômade para populações fixas que se aproximaram mais dos animais, domesticando-os para diversas finalidades. Isto ocorreu há aproximadamente 30.000 anos para os cães e 10.000 para os gatos. Se no início esta relação era baseada apenas na utilidade dos animais para os humanos, a convivência típica com estes foi transformada ao longo do tempo, de forma que, nos dias atuais, animais de estimação são considerados verdadeiros membros da família. A grande proximidade entre esses animais e humanos favorece um intercâmbio constante entre os micro-organismos de suas microbiotas.

Paralelamente a isto, é observado um alto consumo de agentes antimicrobianos, tanto na medicina humana, quanto na veterinária. Já está amplamente documentado que estes agentes exercem pressão de seleção não apenas nos patógenos alvos, mas também, nos micro-organismos da microbiota normal, o que afeta a saúde humana, animal e ambiental, com profundos reflexos no ambiente, pois é neste último que as complexas relações micro-organismos, genes condicionadores de resistência e hospedeiros acontece.

Gatos são animais de estimação que se adequam cada vez melhor às características da vida moderna. Em virtude disso, atualmente, observa-se um crescimento em sua presença nos lares como pets. Ao mesmo tempo, exibem padrões de comportamento que permitem considerá-los como importantes elos da cadeia epidemiológica de micro-organismos que apresentam resistência antimicrobiana.

Este papel dos gatos na disseminação de micro-organismos resistentes assume maior importância em vistas da globalização, pois através de viagens nacionais e internacionais, a disseminação de micro-organismos resistentes pode ocorrer muito rapidamente, pondo em risco a saúde mundial. Genes condicionadores de resistência, principalmente em combinação,

e patógenos resistentes às múltiplas drogas estão se disseminando em velocidade sem precedentes, facilitado pelo mecanismo de transferência horizontal, que permite o intercâmbio de genes entre comensais da microbiota, patógenos e, inclusive, entre espécies diferentes de bactérias.

A enterobactéria *Escherichia coli* (*E. coli*), ao lado de outras Gram negativas, está entre os patógenos com mais alto impacto clínico mundial, pois, já existem cepas desse micro-organismo para as quais nenhum dos antibióticos atualmente disponíveis apresenta eficácia. Cepas de *E. coli* multirresistente a antimicrobianos têm sido relatadas, tanto em infecções relacionadas às instituições de saúde (nosocomiais), quanto em infecções da comunidade.

Entre os vários tipos de resistência microbiana, o de espectro estendido aos beta-lactâmicos (*ESBL*- Extended Spectrum B-lactamase), é considerado um dos mais importantes, pois cepas que apresentam tal fenótipo são resistentes à todas as cefalosporinas, incluindo as de terceira e quarta gerações e, na maioria das vezes, apresentam resistência concomitante a outros grupos de antimicrobianos, principalmente às quinolonas. Além disso, como sua detecção em laboratórios clínicos não é realizada rotineiramente, uma cepa pode apresentar susceptibilidade a uma cefalosporina de terceira geração *in vitro*, porém com o início da terapia antimicrobiana, ocorre a indução das lactamases de espectro estendido em cepas produtoras de *ESBL*, implicando em falha terapêutica.

Tendo em vista a já citada transferência de genes de resistência entre patógenos e comensais, a epidemiologia da resistência antimicrobiana em bactérias indicadoras da microbiota normal, como a *Escherichia coli* pode prever os padrões de resistência em patógenos.

Como outros mamíferos, gatos são colonizados por *E. coli* nos primeiros dias de suas vidas e estão entre os que apresentam um dos mais elevados números de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de fezes desse micro-organismo. Esses animais apresentam algumas características comportamentais que os tornam particularmente interessantes em estudos epidemiológicos, pois apresentam alta interação com os ambientes ao redor de suas residências mesmo quando são domiciliados, tendo geralmente acesso a diversos ambientes, o que facilita contato com micro-organismos de variados nichos.

Atualmente, maior ênfase vem sendo dada para a elucidação das interações hospedeiro, cepas comensais, patogênicas e ambiente, baseadas nas evidências que a estrutura genética de *E. coli* comensal é moldada por múltiplos fatores relacionados ao hospedeiro e ambiente, e os determinantes envolvidos na aquisição de virulência e resistência

antimicrobiana pela bactéria podem, de fato, refletir uma adaptação aos habitats comensais. Apesar de vários trabalhos abordarem o papel do ambiente na disseminação e manutenção de micro-organismos resistentes, este ainda é subestimado.

Desta forma, o presente trabalho consiste em um estudo de prevalência de resistência antimicrobiana em cepas de *E. coli* isoladas de diversos sítios anatômicos de gatos saudáveis, dando ênfase à resistência *ESBL*. E, verifica diferenças em frequências, perfis fenotípicos e classificações filogenéticas entre cepas de *E. coli* resistentes a antimicrobianos originadas de três populações de hospedeiros: gatos cuja residência do tutor é próxima às unidades de assistência à saúde humana; próximas à assistência de saúde veterinária e sem proximidade com esses locais onde o uso de agentes antimicrobianos é rotineiro. O estudo de *E. coli* de diversos sítios anatômicos da microbiota de gatos saudáveis, relacionado às populações expostas a ambientes diferentes, é inédito.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Gatos

2.1.1 Histórico de domesticação

Mamíferos pertencentes à ordem dos carnívoros e à família *Felidae*, os gatos domésticos (*Felis silvestris catus*; Linnaeus, 1758) tiveram sua domesticação primeiramente atribuída à civilização egípcia, com o início estimado em 3.600 anos. Entretanto, descobertas genéticas e achados arqueológicos recentes permitem reconhecer uma origem mais antiga, de aproximadamente 10.000 anos, no Oriente Médio, região do Crescente Fértil que abrange as áreas da Mesopotâmia e do Levante (territórios ou partes dos territórios da Palestina, Israel, Jordânia, Líbano, Síria e Chipre) (CLUTTON-BROCK, 2012).

Fortes evidências apontam a subespécie selvagem *Felis silvestris lybica* (África) como originária dos gatos domésticos. Os gatos selvagens são divididos em cinco grandes grupos segundo sua similaridade genética e são geograficamente distribuídos da seguinte forma: *F. s. silvestres* (Europa), *F. s. bisti* (China), *F. s. ornata* (Ásia Central), *F. s. cafra* (Sul da África) e *Felis silvestres lybica* (África e Oriente Médio). Driscoll et al. (2007) analisaram 979 gatos selvagens e domésticos e concluíram que a maioria dos gatos domésticos estudados apresentavam similaridade genética apenas com a subespécie selvagem *F. s. lybica* (África) atribuindo, desta forma, a origem do gato doméstico a esta subespécie originária da África e inicialmente dispersa pelo Oriente Médio.

Quanto à data da domesticação, um dos achados arqueológicos mais antigos localiza-se na ilha de Chipre, onde foi encontrada uma cova com um homem enterrado junto a um gato, há 9.500 anos. Como os gatos não são nativos das ilhas mediterrâneas, presume-se que tenham sido trazidos de barco da costa oriental. Estes achados permitem concluir que já se estabelecia uma relação pessoal e intencional entre os homens e estes animais (VIGNE et al., 2004).

O período neolítico, durante o qual surgiu a agricultura, também possibilitou a domesticação de vários animais, entre eles cães e gatos. Se os primeiros se caracterizaram como de grande utilidade para os humanos, principalmente por sua alta capacidade de obediência, os gatos, com características mais independentes provavelmente se “auto domesticaram”, uma vez que a convivência com o homem possibilitava uma maior abundância de alimentos. Os grãos produzidos pela incipiente atividade agrícola, assim como o acúmulo de lixo pelas primitivas comunidades atraía roedores que representavam fonte de

alimento para os gatos. Desta forma, a coabitação com o homem garantiu aos gatos acesso ao lixo e aos roedores, em contrapartida, os mesmos dizimavam os roedores, beneficiando as sociedades humanas. Além disso, segundo alguns estudiosos, as características físicas destes animais, principalmente de seus filhotes, despertaram sentimentos de carinho e proteção por parte dos humanos, o que também contribuiu para a sua domesticação. (CLUTTON-BROCK, 2012).

Por esta razão, e por possuir características que se enquadram bem no estilo de vida moderno das famílias, os gatos se tornaram cada vez mais populares como animal de estimação. Nos EUA o número de gatos como pets já é maior que o de cães e, no Brasil, apesar de ainda ser menor, seu crescimento anual é maior que o destes (APPA, 2014; ABINPET, 2013).

2.1.2 Principais aspectos fisiológicos e etológicos

A participação crescente dos gatos nas sociedades humanas como animais de companhia já está amplamente documentada. Atualmente, cães e gatos convivem nos lares como verdadeiros membros da família, o que implica numa alta proximidade entre estes e os humanos, possibilitando o compartilhamento de micro-organismos de suas microbiotas (KRAUSE et al., 2005).

Desta forma, o conhecimento de algumas características fisiológicas e comportamentais do gato, como sua atividade natural de caça, mesmo entre aqueles domiciliados e adequadamente alimentados por seus proprietários; o comportamento de perambular pelas redondezas de suas residências, a não ser que sejam estritamente confinados; a forma como se relacionam com outros gatos e espécies, bem como as características de posse destes animais, pode levar a uma melhor compreensão do papel destes na epidemiologia da resistência antimicrobiana em bactérias de sua microbiota normal.

2.1.2.1 Hábitos alimentares

Essencialmente carnívoros, os gatos necessitam de proteína de origem animal em sua dieta muito mais do que os cães. Vários trabalhos relatam que estes animais, mesmo sendo alimentados por seus proprietários, apresentam um comportamento predatório oportunista, ou seja, demonstram o hábito de caçar, independentemente de terem ou não uma fonte fixa e constante de alimento. Quando os gatos são domiciliados próximos a ambientes naturais,

como matas ou regiões de preservação ambiental, podem provocar um impacto na fauna local, principalmente através da predação de aves e pequenos mamíferos. Entretanto, em regiões urbanas, a atividade natural de caça e o comportamento de perambular pelas redondezas possibilitam o acesso desses animais ao lixo e outros resíduos de atividade humana podendo implicar em riscos à saúde pública através da veiculação de doenças zoonóticas (GERHOLD e JESSUP, 2013).

Considerando o hábito de caça dos gatos mais relacionado aos seus instintos do que à necessidade absoluta de alimentos, é importante determinar as consequências de tal comportamento em gatos urbanos domiciliados, mas com possibilidade de acesso à rua, em relação à comunidade em que estão inseridos. Pois, em suas atividades pode veicular micro-organismos dos vários ambientes que frequentam para as pessoas ou outros animais com os quais entram em contato. Tais riscos são maiores ao se considerar o alto grau de proximidade destes pets com os humanos observado atualmente (GUARDABASSI et al, 2004; KRAUSE et al, 2005; FERREIRA, 2011).

2.1.2.2 Estrutura social, territorialismo e área de vida

Apesar de considerados animais de hábitos solitários até os anos 80, principalmente devido a sua capacidade de sobrevivência de forma solitária, atualmente são considerados como seres gregários, com uma estrutura social bastante complexa, caracterizando uma sociedade hierárquica (CARLSTEAD et al, 1992; CARLSTEAD et al, 1993; CROWELL-DAVIS et al, 2004).

Em geral, constituem colônias matrilineares, exibindo relações afiliativas e cooperativas entre as fêmeas e são capazes de reconhecer os membros que pertencem à mesma colônia. Possuem parceiros preferenciais e, em geral, estão mais próximos e praticam limpeza mútua com mais frequência entre si do que com os outros membros da colônia. (FERREIRA, 2011).

Apresentam alta sensibilidade em relação ao ambiente, a qual tem sido reconhecida há longo tempo (CANNON, 1929 apud BUFFINGTON et al, 2006). Essa sensibilidade se traduz na necessidade de explorar as redondezas, pois conforme documentado por vários autores, o ambiente interno das residências pode ser desinteressante e monótono para esta espécie, o que pode resultar em estresse e várias doenças, além de distúrbios de comportamento (CARLSTEAD et al, 1992; CARLSTEAD et al, 1993; KOOLHAS et al, 1999; WINDMAN et al, 1992; CARLSTEAD; SHEPHERDSON, 2000; BUFFINGTON,

2002). Em geral, o sucesso da adaptação dos gatos ao ambiente interno depende da qualidade desse ambiente em relação aos estímulos que possa proporcionar e da capacidade de adaptação do animal, pois ambientes com poucos estímulos ativam a resposta sistêmica de estresse (WESTROPP et al., 2004; BUFFINGTON, 2004). Muitos estudos têm abordado o uso de estratégias de enriquecimento ambiental para diminuir os efeitos do confinamento estrito. Nesses trabalhos, procuram proporcionar condições de bem-estar através da introdução de “novidades” no ambiente interno que despertam a curiosidade e diminuem os níveis de estresse em gatos restritos aos ambientes internos. Ao mesmo tempo, podem minimizar as consequências do acesso dos gatos à rua, como possibilidade de disseminação de doenças, perigos de atropelamento e brigas com outros cães ou gatos de rua, entre outros. (WINDMAN et al., 1992; VAN PRAAG et al., 2000; BUFFINGTON, 2002; ROCHLITZ, 2005; BUFFINGTON et al., 2006).

A delimitação da área explorada pelos gatos em seu comportamento natural de explorar os arredores de suas residências, denominada “área de vida” tem sido objeto de estudo. Ferreira (2011) estabeleceu, por rádio telemetria, a área de vida de gatos domésticos semi domiciliados em ambiente natural de Mata Atlântica e comparou os seus valores aos encontrados em outros estudos, que analisaram gatos ferais e domésticos, encontrando uma área média de 4,24 a 2,1 ha para os gatos machos e 0,5 a 1,19 ha para as fêmeas. (LANGHAM E PORTER, 1991; GENOVESI et al., 1995; BARRATT, 1997; EDWARDS et al., 2001; BIRO et al., 2004; HARPER, 2004; MOLSHER et al., 2005). Isto significa que, em seu comportamento natural, o gato doméstico explora os arredores de sua residência e, mesmo que receba alimento suficiente exibe o hábito de caça de forma generalista e oportunista (FITZGERALD; TURNER, 2000), percorrendo aproximadamente 3 a 4 quarteirões urbanos (10.000 m²). Suas atividades concentram-se mais no final do dia e durante a noite, sendo desta forma caracterizada como atividade crepuscular-noturna.

Animais ferais que habitam ambientes naturais apresentam área de vida maior que os mesmos em áreas urbanas, principalmente devido à maior concentração de alimentos nas áreas urbanas, geralmente próximos a depósitos de lixo e áreas próximas a locais de alimentação de pessoas (TENNENT e DOWNS, 2008). Gatos domiciliados apresentam área de vida que varia em função de serem ou não castrados e, nesse último caso, a área de vida de gatos machos está relacionada à distribuição de fêmeas, podendo haver sobreposição territorial em caso de um número escasso de fêmeas receptivas (GOLTZ et al., 2008). Fêmeas tendem a apresentar maior sobreposição de áreas, mesmo apresentando área de vida menor

que a de gatos machos e essa área varia predominantemente em relação à disponibilidade de alimento (LIBERG et al., 2000).

2.1.2.3. Microbiota anfibiônica de gatos domésticos

A microbiota normal, ou anfibiônica, de humanos e animais é adquirida logo após o nascimento constituindo-se por elevado número de diversos micro-organismos, como vírus, protozoários, fungos e predominantemente bactérias, que estabelecem relações de comensalismo ou mutualismo com seu hospedeiro. Entre as funções benéficas que desempenham podem ser citadas: barreira inata, ação antibacteriana, síntese de compostos essenciais, participação no metabolismo e regulação do sistema imune. (MIDVEDT et al, 1988; TANNOK, 1999; LIÈVIN et al, 2000; GUARNER; MALAGELADA, 2003; YAN; POLK, 2004;).

Assim como humanos e outros animais, os gatos exibem uma microbiota complexa e diversificada em seus vários sítios corporais, diferindo, entretanto, quanto à abundância ou a diversidade de espécies microbianas. A microbiota normal está presente na pele, cavidades naturais do corpo que entram em contato com a superfície externa e trato digestório. Esta microbiota pode ser dividida em residente e transitória, sendo que na primeira observa-se permanência e estabilidade no conjunto de micro-organismos, pois o sítio corporal na qual está estabelecida possibilita condições favoráveis para a manutenção do ecossistema microbiano. Entretanto, a microbiota transitória é caracterizada como temporária ou instável devido ao meio não oferecer todas as condições necessárias para a sobrevivência dos micro-organismos presentes (SUCHODOLSKI, 2011; TORTORA, 2012).

2.1.2.3.1 Microbiota da pele de gatos domésticos

A microbiota da pele de gatos apresenta composição e distribuição variável, sendo maior a concentração de micro-organismos nas regiões que apresentam umidade e temperatura mais elevadas. Sua constituição também varia em função do clima, da idade do animal e de hábitos de higiene, sendo que a maioria dos micro-organismos em contato direto com a superfície corporal dos gatos não se torna residente em virtude das secreções sebáceas e sudoríparas apresentarem propriedades antimicrobianas. Além disso, o pH da pele a torna inóspita para grande parte de micro-organismos. Entretanto, algumas bactérias como *Micrococcus* sp, *Staphylococcus* coagulase-positiva (SCP), *Staphylococcus* coagulase-

negativa (SCN), *Streptococcus α-hemolíticos* e *Acinetobacter* colonizam a pele destes animais constituindo sua microbiota residente. Entre as espécies de estafilococos coagulase-positivas, *Staphylococcus pseudintermedius* é a mais isolada (RUBIN; CHIRINO-TREJO, 2011), sendo também encontrada como patógeno oportunista em piodermites de cães e gatos (FITZGERALD, 2009). Enquanto *Bacillus spp*, *Corynebacterium sp*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas sp* estão presentes como microbiota transitória e, em alguns casos, como patógenos oportunistas (KAHN; LINE, 2010).

Ampla variedade de fungos e leveduras também compõem a microbiota da pele de cães e gatos, sendo estes: *Candida sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Geotrichum* e *Trichosporon* (CLEFF et al., 2007; HOLANDA et al., 2007).

Durante o hábito natural de higienização dos gatos através do ato de se lambar, micro-organismos da microbiota de seus diversos sítios corporais são postos em contato. Desta forma, bactérias presentes no reto são transferidas para áreas como boca e nariz e, destas para várias outras superfícies corporais, como abdômen, dorso e virilhas, por exemplo. Uma das implicações deste comportamento é a presença, em geral transitória, de micro-organismos do trato intestinal, como *E. coli*, em outros locais do corpo além do intestino grosso (DAVIS et al., 2011).

2.1.2.3.2 Microbiota da boca de gatos domésticos

A mucosa oral de humanos e de animais apresenta pH neutro, temperatura e umidade elevadas, além da presença abundante de nutrientes. Tais características possibilitam a presença de uma microbiota densa e complexa, sendo constituída por grande variedade de bactérias e leveduras (SANTINE, 2013).

As espécies de micro-organismos mais frequentemente encontradas na mucosa oral de gatos e que têm sido isoladas na maioria dos casos de mordedura em humanos por estes animais são: *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Micrococcus sp*, *Proteus vulgaris*, *P.mirabilis*, *Candida sp*, *Pseudomonas sp*, *Streptococcus sp*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Clostridium sp*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp*, *Neisseria sp*, *Pasteurella multocida*, *Moraxella sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Enterococcus sp.*, *Porphyromonas sp.*, *Prevotella sp.*, *Propionibacterium sp.* *E Fusobacterium sp.* (MITNOVESKI; KIMBLE, 2004; WESTLING et al., 2006; SANTOS et al., 2007; PATRONECK; SLAVINSK, 2009; WEINBERG; BRANDA, 2010; ABRAHAMIAN; GOLDSTEIN, 2011).

Enterobacteriaceas, como *E. coli* e outras bactérias da microbiota intestinal, podem fazer parte da microbiota bucal de gatos, nela permanecendo de forma temporária e instável, como constituinte transitório; ou de forma permanente, como residente. Esta permanência depende dos hábitos de higiene, tipo de alimentação, comportamento e interação social (MARTINS et al., 2012), sendo mais abundantemente encontrada na microbiota oral de gatos que vivem em colônias, isto é, animais que apresentam muitas interações com outros de sua espécie.

2.1.2.3.3 Microbiota da genitália externa de gatos domésticos

A composição da microbiota da vagina é influenciada por fatores hormonais e ambientais, sendo constituída principalmente por bastonetes Gram-negativos, cocos Gram-positivos, bactérias anaeróbias, micoplasmas e fungos, cujos tipos e abundância de espécies variam principalmente segundo os fatores acima citados (SUCHODOLSKI, 2011; TORTORA, 2012).

Em vários estudos sobre a composição da microbiota da mucosa vaginal de gatas são relatadas altas frequências de isolamento de bastonetes gram-negativos provenientes do trato gastrointestinal, especialmente *E. coli* e gram-positivos como *Streptococcus spp* (CAMPERO et al., 1992; SCHOCKEN-ITURRINO et al., 1992b; KUNZ et al., 2002). Também são encontradas *Staphylococcus* coagulase negativo, *Streptococcus canis* (CLEMETSON; WARD, 1990), *Proteus vulgaris* (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 1992b) *Lactobacillus spp*, *Corynebacterium spp*, *Bacillus spp* e Leveduras (JARDIM et al., 1992).

Embora reconhecida a diversidade microbiana na mucosa prepucial de gatos domésticos (FELDMAN; NELSON, 1996; VERTEGEN, 2008) poucos estudos abordam sua composição. Entretanto, para gatos selvagens, como o gato do mato pequeno, gato marajá, onça pintada e jaguatirica foram encontrados os seguintes micro-organismos: *Staphylococcus sp.*; *Streptococcus sp.*; *Corynebacterium sp.*; *Escherichia coli*; *Proteus sp.*; *Yersinia pseudotuberculosis* (GUIDO et al., 2000).

O decúbito ventral é a postura mais frequentemente exibida por esses animais em repouso, o que pode levar à exposição da mucosa peniana ao ambiente. Nessa situação, microrganismos podem interferir na microbiota natural da cavidade prepucial e da uretra, colonizando-a transitoriamente ou se estabelecendo como microbiota residente, e ainda, podendo atuar como patógeno do sistema genital e urinário, como é o caso da *E. coli* (JOHNSON, 2006; NASCIMENTO et al., 2011).

2.1.2.3.4 Microbiota intestinal de gatos domésticos

A microbiota intestinal de animais de produção, principalmente de grandes e pequenos ruminantes tem sido tema de vários estudos. Entretanto, embora apresente importância sobre vários aspectos, inclusive em estudos epidemiológicos sobre a resistência antimicrobiana (GUARDABASSI et al., 2004; BRYAN et al., 2004; JOHNSON et al., 2008, 2009), este assunto é pouco estudado em relação aos animais de companhia. A maioria dos conhecimentos sobre a composição da microbiota de animais monogástricos vem do estudo desta em humanos (RASTALL et al., 2004).

Desta forma, ainda hoje são escassos os conhecimentos sobre a microbiota intestinal de gatos domésticos, principalmente em virtude da dificuldade de isolamento e identificação de alguns micro-organismos. Entretanto, a utilização de técnicas moleculares tem permitido superar as dificuldades de cultivo apresentadas por alguns componentes desta microbiota (DESAI et al., 2009).

Gatos, assim como outros animais, têm o trato intestinal colonizado logo após o nascimento. As diferentes porções deste trato albergam diferentes espécies e números de micro-organismos, pois ocorrem diferentes condições ambientais em seus vários compartimentos, variando principalmente o pH. Sendo assim, no intestino delgado predominam lactobacilos, estreptococos, enterobactérias, *Bifidobacterium spp.*, *Bacteroides spp.* e clostrídios, em uma densidade populacional de $10^4 - 10^8$ UFC/ml. A região mais colonizada é o intestino grosso, onde ocorrem cerca de $10^{11} - 10^{12}$ UFC/ml, predominando anaeróbios restritos como *Bacteroides spp.*, *Ruminococcus spp.*, *Butyrivibrio spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Peptoestreptococcus*, *Bifidobacterium spp.*, *Atopobium spp.* e *Peptococci*. Os anaeróbios facultativos, também abundantes, são representados principalmente pela família *Enterobacteriaceae*, entre estas predomina *E. coli*. Podem ser encontrados ainda outros facultativos como: lactobacilos, enterococos e estreptococos, além das leveduras que ocorrem em menor número (LEY et al., 2008).

Grande similaridade no perfil taxonômico entre a microbiota intestinal de gatos, vários mamíferos e humanos foi verificada por Desai et al. (2009) através de identificação molecular com o gene *cnp-60*. Entretanto, foram encontradas diferenças na abundância de algumas espécies entre gatos com acesso irrestrito ao ambiente interno em relação aos restritos, sendo que nos primeiros houve o predomínio de lactobacilos, particularmente *L. ruminus*, relacionados a sua atividade de caça.

Entre os anaeróbios facultativos, *E. coli* é o micro-organismo mais abundante e, em relação a outros mamíferos, os gatos são os que apresentam maior número de UFC/g de fezes deste micro-organismo (GLYLES; FAIRBROTHER, 2004).

2.2 A relação entre humanos e gatos; benefícios desta relação.

A antiga relação entre humanos e animais de estimação, principalmente cães e gatos, tem se intensificado. Atualmente esses animais são vistos como verdadeiros membros das famílias (GUARDABASSI et al, 2004). O reconhecimento dos benefícios advindos da relação entre humanos e animais de estimação vem aumentando nos dias atuais à medida que mais estudos comprovam estes fatos (BARKER, 1999; ROCHA, 2005; SOUZA, 2005) e, provavelmente, foi um dos fatores responsáveis pelo atual comportamento humano em relação aos animais de companhia.

Segundo a psicóloga e médica veterinária, Hannnelore Fuchs (1998) várias características positivas desta relação podem ser citadas, como: disponibilidade constante de afeto, companhia, amizade, contato físico, sensação de segurança e proteção. Desta forma, tais características se traduzem em inúmeros benefícios para os humanos, entre estes, alívio para situações tensas, sensação de bem-estar e redução nos níveis de estresse.

Conforme publicado na revista "*American Journal of Cardiology*", pessoas que interagem com gatos tendem a apresentar níveis controlados de estresse e de pressão arterial, além de estarem menos propensas a desenvolver problemas cardíacos. Nessas situações, foi constatado que a presença do animal resulta na redução da ansiedade e diminuição de depressão, uma vez que os animais incentivam a atividade física, tanto para levá-los aos passeios como para a realização dos cuidados diários. (WOOD et al., 2005).

Esses efeitos benéficos são particularmente notados em pessoas idosas, pois ao adotarem gatos como animais de estimação, têm a oportunidade de atuarem como cuidadores, o que pode aumentar sua autoestima, através da sensação de serem úteis e necessários. São também motivados à atividade física ao se dedicarem às necessidades de seus pets, como passeios, banhos e alimentação, por exemplo (SCOTT, 2013). A interação social também aumenta, pois nos passeios, consultas veterinárias e outras atividades têm a oportunidade de trocar experiências com outros tutores de animais e estabelecer novos contatos sociais e até laços de amizade.

Com relação às crianças, já está amplamente documentado que a convivência com um pet ajuda a aumentar seu senso de responsabilidade, compreensão, zelo, amor e iniciativa,

além de adquirir mais confiança (BARKER, 1999; SOUZA, 2005). A vida familiar também é amplamente beneficiada com a presença de um animal de estimação, sendo relatados diminuição das tensões e aumento na compaixão, que resultam em melhores relações entre os membros da família (BARKER, 1999), pois os animais despertam emoções comunicativas nas pessoas (ROCHA, 2005).

Além da convivência destes animais como membros de família, vem aumentando o uso de animais de estimação em diversos tipos de terapias, as terapias assistidas por animais, nas quais os objetivos são melhorar a qualidade de vida humana (OLIVA, 2004). Apesar de cães e cavalos serem mais tradicionalmente utilizados nestas terapias, atualmente são muitos os relatos de terapias bem-sucedidas realizadas com gatos, sendo descritas grandes melhoras em crianças com autismo, idosos com mal de Alzheimer (SCOTT, 2013), doentes crônicos hospitalizados ou sob cuidados na própria residência, assim como dependentes de álcool e outras drogas.

2.2.1 Os gatos domésticos na sociedade humana atualmente: características das populações de gatos e de seus tutores

O desenvolvimento da espécie humana foi diretamente afetado pelo relacionamento desta com cães e gatos, uma vez que a domesticação teve início no mesmo período em que o homem passou a desenvolver relações de grupo. Dessa forma, urbanização e domesticação têm muito em comum e são indissociáveis (BECK, 1973).

Se por um longo tempo, os cães foram preferidos como pets, essa preferência vem mudando, principalmente em função do estilo de vida moderno, no qual espaço e tempo são escassos. Desta forma, cresce o número de lares onde o animal de estimação é o gato, pois suas características permitem que sejam criados em espaços menores e ainda que seus proprietários gastem um tempo menor em seus cuidados diários em relação a outros animais de estimação, como os cães, por exemplo (ABINPET, 2013; APPA, 2014). A atual população de gatos domiciliados no Brasil é estimada em 21,3 milhões e é considerada a segunda maior população mundial, sua taxa de crescimento anual é de 8%, sendo superior a de cães. Estima-se, ainda, que até 2022 as populações de cães e gatos serão iguais no Brasil (ABINPET, 2013). Em alguns países como Estados Unidos, França e Alemanha, a população de gatos já é maior que a de cães. (JUSTEN, 2014).

As populações de gatos podem ser classificadas segundo seu grau de dependência humana na provisão de alimentos, água, abrigo e outros cuidados em: (a) *domiciliadas*:

totalmente dependentes, restritos e supervisionados por um proprietário; (b) *semi-domiciliadas*: totalmente dependente, semi-restritos, eventualmente classificado como “de família”; (c) *de vizinhança*: semi-dependente, semi-restrito ou sem restrição, sob responsabilidade coletiva; (d) *feral*: independente e sem restrição, embora necessite de sobras para sobrevivência, não possui um responsável, sem interação com humanos.

Apesar do aumento da popularidade do gato doméstico como animal de estimação observado nas últimas décadas, milhares destes animais pelo mundo todo, incluindo países desenvolvidos, são abandonados nas ruas ou deixados em abrigos de animais (LEVY; CRAWFORD, 2004). A prática humana de alimentar populações de gatos ferais já está amplamente documentada. Nos E.U.A, vários estudos mostram que a população de gatos ferais compõe cerca de 36% a 46% do total de sua população de gatos, a qual é alimentada por cerca de 12% da população da comunidade local. Desta forma, percebe-se que alimentar gatos de rua é uma atividade generalizada, registrada em habitantes de várias cidades, em diversos países. Estudos mostram, ainda, que esta prática ocorre independentemente do nível socioeconômico da população. (MANNING et al., 1992; JOHNSON et al., 1994; LEVY et al., 2003).

Ao estudar as características dos alimentadores de gatos ferais, Centoze; Levy (2002), verificaram que 84% destas pessoas eram mulheres com idade média de 45 anos (variando entre 19 e 74 anos), sendo que a maioria já mantinha outros gatos em domicílio e as principais razões para alimentá-los, segundo esse estudo, eram simpatia e amor por esses animais. Outro fato interessante encontrado é que a maioria das colônias de gatos era, em geral, constituída por quatro a doze animais. Entretanto, estes estudos registraram também que, embora essas pessoas se preocuparam com a sobrevivência desses animais, não tomavam iniciativas em relação à sua castração (LEVY; CRAWFORD, 2004).

Isto representa um sério problema de saúde pública, uma vez que esses animais se reproduzem em altas taxas, levando a uma grande população de animais de rua (NUTTER et al., 2004) potencialmente transmissora de diversos micro-organismos, entre eles alguns causadores de zoonoses ou micro-organismos de sua microbiota portadores de genes codificadores de resistência antimicrobiana que podem ser horizontalmente transferidos para outros hospedeiros. Além disso, grande parcela da população de gatos deve ser classificada como semi domiciliada, pois, mesmo tendo uma residência fixa e um tutor responsável por seus cuidados, geralmente também têm acesso aos arredores de suas residências, entrando em contato frequente com populações de gatos ferais. Nessas interações ocorrem constantes

trocas de micro-organismos de suas microbiotas que podem ser transferidos às pessoas e outros animais que habitam a mesma residência (GERHOLD; JESSUP, 2012).

Apesar das maiores colônias de gatos estabelecerem-se em propriedades públicas, como parques e instituições, formando as populações mais visíveis e controversas, a maioria das populações de gatos vive em pequenos grupos, próximos às casas de quem os alimenta (LEVY; CRAWFORD, 2004), o que permite interações constantes entre as populações ferais e os gatos semi-domiciliados, pois tais populações ocorrem dentro das áreas de vida de gatos semi-restritos, contribuindo para o compartilhamento de micro-organismos de suas microbiotas, o que pode representar um problema de saúde pública.

2.3 *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, da grande família das *Enterobacteriaceas*. É um micro-organismo ubíquo, encontrado em vários ambientes como: água, solo e plantas. Entretanto, é prevalente como comensal da microbiota de humanos e outros animais (NATARO; KAPER, 1998), na maioria endotérmicos. Pode estar presente também na microbiota de animais ectotérmicos, especialmente répteis da classe dos quelônios (PESSOA, 2009).

Theodor Escherich a identificou em 1885, a partir de fezes de indivíduos saudáveis, denominando-a então *Bacterium coli communi*, em razão de sua alta prevalência na microbiota intestinal. Esta espécie bacteriana foi identificada inicialmente na microbiota normal de humanos e animais saudáveis, o que a caracterizava como comensal. Entretanto, a capacidade de colonizar sítios originalmente estéreis, como sangue, líquido e vísceras, a caracterizava também como patógeno oportunista. (ROBINS-BROWNE, 1987).

No início do século vinte, severos surtos de gastroenterite infantil foram atribuídos a uma cepa desta bactéria que denominaram *Bacterium coli napolitanum*. Vários episódios de diarreia severa ocorreram a seguir, os quais foram atribuídos a outras cepas da mesma bactéria que eram denominadas de acordo com seu descobridor, gerando muita confusão em sua nomenclatura (DE et al, 1956 apud ROBINS-BROWNE, 1987).

Em 1944, Fritz Kauffmann propôs a sorotipagem baseada na presença de antígenos somáticos (antígeno O), capsulares (antígeno K) e flagelares (antígeno F) como critério de classificação, que é usado até os dias atuais, com modificações. O antígeno O é formado por oligossacarídeos cuja composição e ordem conferem sua diversidade, sendo conhecidos mais

de 180 sorogrupos devido a esse antígeno e mais de 60 antígenos H, possibilitando mais de 10.000 combinações entre estes (NATARO; KAPER, 1998).

Portanto, após a constatação de surtos de diarreia severa pelo micro-organismo, algumas cepas de *E. coli* foram reconhecidas como patógenos primários. Os aspectos clínicos, epidemiológicos e genéticos conhecidos sobre este micro-organismo, permitem agrupar suas cepas em três grandes categorias: comensais, patogênicas intestinais e patogênicas extra intestinais, sendo estas últimas relacionadas à meningite, sepse e infecções do trato urinário (ROBINS-BROWNE, 1987).

2.3.1. Tipos de *E. coli* e caracterização epidemiológica

2.3.1.1 *E. coli* comensal e a microbiota

A bactéria *E.coli* da microbiota intestinal apresenta importantes funções na manutenção da homeostase deste trato, bem como no organismo como um todo. Entre as principais funções podem ser citadas: antibacteriana, imunomoduladora e nutricional. (CHEESMAN; GUILLEMIN, 2007).

A ocupação da mucosa intestinal por cepas comensais desta bactéria estabelece uma barreira mecânica à colonização por outras bactérias; a competição pelos nutrientes disponíveis no meio regula a colonização deste trato e, a produção de substâncias com atividades antimicrobianas (colicinas) restringem o crescimento de bactérias alóctones. Todas essas atividades, em conjunto, resultam em efetiva atividade antibacteriana. (TANNOK, 1999; LIÉVIN et al, 2000).

Bactérias da microbiota normal e seus produtos apresentam efeitos de maturação do sistema imune e atuam na tolerância imunológica (GUARNER; MALAGELADA, 2003; YAN; POLK, 2004). Além disso, bactérias da microbiota podem fermentar substratos que chegam ao cólon não digeridos e fornecer energia decorrente desta digestão às células do epitélio intestinal, representando importante efeito trófico. A síntese de vitamina K também representa uma das funções nutricionais da microbiota intestinal (EDWARDS; PARRET, 2002).

Entretanto, apesar dos vários efeitos benéficos citados, em algumas condições, bactérias da microbiota residente podem adquirir fatores de virulência e/ou resistência antimicrobiana; ou o hospedeiro pode apresentar severa diminuição de sua imunidade. Estas situações podem romper o complexo balanço entre hospedeiro e micro-organismos, que pode

significar a diferença entre os benefícios atribuídos às cepas comensais e a instalação de doenças. (PICARD et al, 1999; KAPPER et al, 2004; EWERS et al, 2007).

Estudos têm associado a presença de um elevado número de cepas comensais de *E. coli*, assim como a diminuição na diversidade de micro-organismos na microbiota intestinal como um dos fatores predisponentes à doença inflamatória intestinal, potencializando, por exemplo, infecções por *Campylobacter jejuni* (ERRIDGE et al., 2010; HAAG et al., 2012)

2.3.1.2 - *E. coli* patogênica intestinal ou diarreio gênica

As cepas patogênicas intestinais, também denominadas diarreio gênicas, são classificadas em seis patótipos de acordo com os fatores de virulência que apresentam e os sintomas clínicos que manifestam, sendo elas: enteropatogênicas (EPEC); enterotoxigênicas (ETEC); enterohemorrágicas (EHEC), também denominadas shigatoxigênicas (STEC); enteroinvasivas (EIEC); enteroagregativas; (EAEC) e de aderência difusa (DAEC). (KAPER et al., 2004). Estão distribuídas nos grupos filogenéticos A, B₁, D, além de algumas linhagens que não apresentam grupo específico. Os fatores de virulência que apresentam foram, provavelmente, adquiridos por transferência horizontal entre membros distintamente relacionados na evolução das linhagens (RUSSO; JOHNSON, 2000).

2.3.1.2.1 *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

Esta cepa é uma das principais causadoras de diarreia em humanos, sendo mais comum em crianças de até dois anos. Apresenta alta morbidade em países em desenvolvimento. (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002). Causa degeneração e inflamação da lâmina própria devido a uma série de eventos que culminam no rearranjo do citoesqueleto do enterócito após a etapa inicial de firme adesão. Esta lesão recebe o nome de “attaching and effacing” (A/E) e caracteriza-se pela formação de uma espécie de “pedestal” na célula intestinal ao qual a bactéria se fixa firmemente, a partir daí ocorre o encurtamento das microvilosidades adjacentes, levando à diminuição da capacidade absorptiva da célula e à diarreia. (NATARO; KAPER, 1998).

As cepas EPEC podem ser classificadas em típicas ou atípicas, conforme apresentem ou não o plasmídeo EAF (*E. coli adherence factor*), respectivamente. Ambas causam lesões A/E. (TRABULSI et al., 2002).

Estudos recentes relataram aumento na prevalência de cepas EPECs atípicas (aEPEC), tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento, este fato ocorre em

virtude de cepas aEPEC apresentarem reservatórios em humanos e em animais domésticos. (RODRIGUES, 2013).

Além disso, algumas cepas aEPEC também apresentam genes capazes de codificar aderência agregativa, típicos de cepas EAEC, o que torna difícil sua classificação. (VASCONCELLOS, 2014). Apesar de apresentar maior prevalência em humanos, cepas EPEC também podem ocorrer em bovinos, suínos, carneiros, cães e gatos. (BORGES, 2011).

Embora em gatos a prevalência seja pouco conhecida, alguns autores a isolaram em gatos diarreicos (POPISCHIL et al., 1987), enquanto outros consideram o gato um possível reservatório para humanos por terem isolado esta bactéria tanto em animais com diarreia quanto em gatos saudáveis (MORATO et al., 2008).

2.3.1.2.2 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

As infecções causadas por cepas ETECs são mais frequentes em crianças e viajantes de países em desenvolvimento. Na maioria dos casos manifesta-se como síndrome diarreica muito severa, com sintomas semelhantes à cólera, síndrome caracterizada por diarreia profusa causada pelo *Vibrio cólera*. Entretanto, em alguns casos a diarreia pode ser branda (KUHNERT et al., 2000; KAPER et al., 2004)

Estas cepas apresentam adesinas que permitem a colonização do intestino delgado onde *E. coli* comensal não ocorre em elevado número. Expressam enterotoxinas termo estáveis e termo lábeis, sendo estas últimas estreitamente relacionadas com a toxina da cólera (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002; KAPER et al., 2004).

Animais recém-nascidos, principalmente leitões, bezerros, cordeiros (KUHNERT et al., 2000) e cães (HAMMERMUELLER et al., 1995) também podem ser acometidos por estas cepas.

2.3.1.2.3 *E. coli* shigatoxigênica (STEC)

As cepas STEC apresentam maior prevalência em países desenvolvidos e acometem mais crianças e idosos. Podem causar sintomas muito severos (SUSSMAN, 1985) e evoluir para síndrome hemolítica urêmica em cerca de 2 a 7% dos indivíduos acometidos (CLARKE, 2001).

Bovinos e pequenos ruminantes são considerados os principais reservatórios naturais de cepas STEC que acometem humanos (BETTELHEIM, 2003). São relatadas baixas prevalências destas cepas em cães e gatos (KRAUSE et al., 2005). Porém cepas STEC já

foram isoladas de gatos assintomáticos convivendo com humanos com diarreia (BUSCH et al., 2007).

Os primeiros grandes surtos ocorreram nos EUA, em 1982, relacionados ao consumo de hambúrguer mal cozido que foram atribuídos à cepa O157: H7 (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002). Embora esta cepa seja mais relatada em surtos por STEC, recentemente outras cepas, como: O111, O103, O26 também têm sido relacionadas a surtos que ocorreram respectivamente nos anos de 2004, 2013 e 2014. Em 2012 e 2013, os surtos de cepas STEC não O157 apresentaram maior prevalência. Apesar de relacionada mais frequentemente à exposição à carne contaminada, vários relatos têm permitido reconhecer vegetais como verduras, frutas e legumes na cadeia epidemiológica de infecções por STEC recentemente. (CDC, 2014).

2.3.1.2.4 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Infecções por cepas EIEC são mais frequentes em países em desenvolvimento, não havendo diferenças quanto à faixa etária acometida. Estas cepas apresentam alguns fatores de virulência também presentes no gênero *Shigella*. (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002). São capazes de penetrar intimamente as células da mucosa intestinal através de células que circundam o folículo linfóide. Após a penetração induzem apoptose dos macrófagos evitando, assim, a fagocitose por essas células. Produzem ainda citotoxinas que ativam a liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios pelas células hospedeiras que culminam em ulceração e inflamação da mucosa intestinal (NAVANEETHAN; RALPH, 2008; RODRIGUES et al., 2008).

2.3.1.2.5 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Infecções por estas cepas apresentam maior prevalência em crianças e viajantes de países em desenvolvimento, também podem ser relacionadas à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), contribuindo com quadros de diarreia persistente em indivíduos imunocomprometidos. (THEA et al, 1993 e MAYER et al, 1995).

A patogenia em *E. coli* enteroagregativa é decorrente da presença de fimbrias de aderência agregativa (AAFs). Apresentam ainda, a proteína dispersina que contribui para o efeito agregativo das fimbrias. (CZECZULIN et al., 1999; KAPER et al., 2004).

Surto ocorrido em países desenvolvidos como Alemanha, Reino Unido e Japão, na década de 90, têm caracterizado cepas EAEC como patógenos emergentes (HUPPERTZ et al., 1997).

2.3.1.2.6 *E. coli* difusoaderente (DAEC)

Caracterizada por causar diarreia em crianças com mais de um ano de idade, apresenta fimbrias especiais (F1845) responsáveis pela aderência difusa e adesinas relacionadas à transdução de sinais para a célula hospedeira que levam ao rearranjo do citoesqueleto e, consequentemente às lesões celulares (NATARO et al., 1996). A presença desta cepa induz à ligação dos receptores da célula hospedeira ao componente C3bBb do sistema do complemento desencadeando o efeito cascata que culmina na resposta da célula hospedeira e nos efeitos inflamatórios. (KAPER et al., 2004).

2.3.1.3 *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC)

Estas cepas causam infecções em outros sítios corporais que não o trato intestinal e são de origem filogenética diferente das cepas comensais e das patogênicas intestinais. Exibem, ainda, aspectos epidemiológicos que as diferem das demais cepas de *E. coli*. Podem ocorrer no trato intestinal de humanos e outros animais sem causar sintomas. (SMITH et al., 2007). São responsáveis pela maioria dos casos de infecções do trato urinário que ocorrem na comunidade (70 a 95%) e, por cerca de 50% das mesmas infecções nosocomiais (FOXMAN et al., 2003).

Estão relacionadas às infecções do trato urinário (UPEC), à sepse (SEPEC: Septicemic *E. coli*) e à meningite neonatal (MNEC: Meningitis-associated *E. coli*). (WILFERT, 1978; MARTIN et al., 1997; RUSSO; JOHNSON, 2000; KAPER et al., 2004). Embora possam causar diferentes tipos de infecções em diversos sítios anatômicos e afetar variados hospedeiros, as cepas de *E. coli* extra intestinais apresentam similaridade. Desta forma, todas estas cepas foram agrupadas como ExPEC (“Extra intestinal pathogenic *E. coli*”) (JOHNSON et al., 2000; JOHNSON et al., 2001).

Cães e gatos são considerados importantes reservatórios de cepas UPEC para humanos. (LISTER et al., 2009).

2.4 Análise filogenética em *E. coli*

A determinação do grupo filogenético representa importante ferramenta na caracterização de cepas de *E. coli*, uma vez que os isolados desta bactéria podem apresentar características fenotípicas, genotípicas, nicho ecológico e habilidade de causar doenças que variam em função de sua classificação filogenética. Desta forma, a caracterização filogenética de *E. coli* pode ser utilizada na triagem de isolados, selecionando cepas para serem testadas

para genes codificadores de fatores de virulência. (TENAILLON et al., 2010; ALM et al., 2011).

Quanto à origem filogenética, as cepas de *E. coli* podem ser distribuídas em quatro grupos principais: A, B₁, B₂ e D. As cepas virulentas extra intestinais (ExPEC) pertencem, em sua maioria, ao grupo B₂ e, menos frequentemente ao grupo filogenético D, enquanto as cepas comensais de *E. coli* pertencem, geralmente, aos grupos A e B₁. (PICARD et al., 1999; JOHNSON; STELL, 2000; CLERMONT et al., 2000). Análise filogenética pode ser feita através da ribotipagem (do RNA ribossômico), da eletroforese de enzimas multilocus, por Triplex PCR e, mais recentemente, por Quadriplex PCR. As duas primeiras técnicas citadas são complexas e demandam muito tempo para sua realização, dificultando triagens rotineiras. Entretanto, a determinação por Triplex PCR, um método rápido e de baixo custo desenvolvido por Clermont et al. (2000), baseada na detecção dos genes *chuA*, *yjaA* e de um fragmento anômalo de DNA (TspE4C2) permite a classificação de *E. coli* dentro dos quatro principais filogrupos. Isto é feito baseado na combinação da presença e ausência desses genes. O gene *chuA* está sempre presente nos grupos filogenéticos B₂ e D e ausente nos grupos A e B₁, enquanto o gene *yjaA* é ausente nos grupos B₁ e D, mas pode estar presente ou ausente no grupo A e está sempre presente no grupo B₂, o fragmento TspE4C2 é sempre ausente no grupo A, presente no grupo B₁, mas pode estar presente ou ausente nos grupos B₂ e D. O esquema apresentado a seguir resume essas informações: A (*chuA*⁻, TspE4.C2⁻, *yjaA*^{-/+}), B₁ (*chuA*2⁻, TspE4.C2⁺, *yjaA*2⁻), B₂ (*chuA*⁺, TspE4.C2^{-/+}, *yjaA*⁺) e D (*chuA*⁺, TspE4.C2^{-/+}, *yjaA*⁻).

Recentemente, Clermont et al. (2013) aperfeiçoaram a detecção filogenética de *E. coli* para reconhecer os oito grupos filogenéticos atualmente conhecidos (A, B₁, B₂, C, D, E, F) através da utilização de Quadriplex PCR.

Poucos trabalhos têm verificado a filogenia de cepas de *E. coli* isoladas de animais de companhia, como cães e gatos. Entre estes, podem ser citados, o trabalho de Ozugui (2008), no Brasil e o do grupo de Davis (2011), nos EUA. O primeiro verificou a origem filogenética de cepas de *E. coli* isoladas da urina de cães e gatos com infecção do trato urinário tendo verificado, entre os isolados provenientes de gatos, somente os filogrupos B₂ (maioria dos isolados) e D, e, entre as cepas oriundas de cães foram verificados os quatro principais filogrupos. Enquanto os estudos conduzidos com gatos saudáveis, por Davis et al. (2011), nos EUA, verificaram alta prevalência de cepas de *E. coli* do grupo B₂.

2.5 Antimicrobianos: definição e usos gerais

Classe de fármacos consumidos frequentemente em unidades de assistência de saúde humana e veterinária, na comunidade e também utilizados em animais de produção como promotor de crescimento ou em práticas de profilaxia. São um dos poucos agentes farmacológicos que não afetam somente os pacientes que os utilizam, mas interferem no ambiente hospitalar ou na comunidade, por alterar a ecologia microbiana. (ANVISA, 2010).

Definidos como substâncias capazes de destruir micro-organismos ou inibir seu crescimento, sendo respectivamente bactericidas ou bacteriostáticos. Quanto à sua origem podem ser produzidos naturalmente por micro-organismos, sendo então denominados antibióticos. Os sintetizados artificialmente são denominados quimioterápicos. Na prática, fármacos de origem natural (incluindo análogos e derivados) são considerados antibióticos. (TAVARES, 2000; RANG et al., 2007).

2.5.1 Linha do tempo da descoberta dos antimicrobianos

A busca por substâncias capazes de inibir o crescimento microbiano, ou mesmo eliminá-lo, teve início com o advento da era microbiana (WRIGTH, 2007). Após a segunda metade do século XIX, o conhecimento da etiologia microbiana de doenças como tuberculose, cólera e febre tifoide, através de estudos conduzidos por Robert Koch, levaram paralelamente à busca por substâncias capazes de destruir esses e outros micro-organismos causadores de enfermidades. (GUIMARÃES et al., 2010).

Nos anos 40, a produção em escala industrial das penicilinas, descobertas por Fleming em 1928, representou um grande avanço na área da saúde, trazendo a possibilidade de tratamento para várias doenças anteriormente incuráveis. (WRIGTH, 2007). As primeiras penicilinas eram eficazes contra micro-organismos Gram-positivos. Entretanto, modificações químicas em sua molécula original naturalmente produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum* (*notatum*) permitiram ampliar seu espectro de ação contra micro-organismos Gram-negativos, dando origem às ampicilinas. As cefalosporinas, antibióticos da mesma classe das penicilinas, produzidas pelo micro-organismo *Cephalosporium acremonium* apresentam espectro de ação ampliado para Gram-negativos. Tendo em vista a produção de penicilinases, foram produzidas a metilpenicilina e oxacilina, derivados sintéticos de penicilina resistentes à ação dessas enzimas. Entre os anos 40 a 50, foram produzidos os aminoglicosídeos e as polimixinas. (TAVARES, 2000).

A década de 50 a 60 ficou conhecida como a “era de ouro dos antibióticos”, com a produção de várias novas classes, como a dos macrolídeos, lipopeptídeos, glicopeptídeos, tetraciclina, cloranfenicol e estreptograminas. Após 1962 foram sintetizadas a rifamicina e as quinolonas, esta última classe representou importante avanço no tratamento de infecções por micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e rickettsias. Derivados sintéticos produzidos na década de 60, como isoniazida e metronidazol permitiram tratar infecções por micobactérias e anaeróbios respectivamente, além de trimetopim, que associado às sulfas, permitiu melhora na atividade deste quimioterápico. (FERNANDES, 2006; PUPO et al., 2006).

Na segunda metade dos anos 80, foram introduzidas as fluorquinolonas, representando melhora na atividade e espectro de ação das primeiras quinolonas, como o ácido nalidíxico, a partir do qual foi desenvolvida. O imipenem, derivado sintético betalactâmico, e análogos da eritromicina, do grupo dos macrolídeos foram sintetizados a partir de protótipos naturais nesse período, e representaram importantes ferramentas terapêuticas. Nos anos 90, a associação de dois derivados semissintéticos de produtos naturais microbianos, a quinupristina e a dalbapristina, aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), foram relevantes na contenção de infecções por *Enterococcus faecium* vancomicina resistentes. (GUIMARÃES et al., 2010).

A partir de 2000, poucas novas classes de antimicrobianos foram produzidas, apesar da área contar com recursos importantes como a genômica e a triagem de coleções de compostos informatizada. Assim, a partir de 2000, poucas novas classes foram introduzidas: em 2000, as oxazolidona; em 2004, os ketolídeos e em 2005, as gliciliclinas. (GUIMARÃES et al., 2010).

2.5.2 Principais classes de antimicrobianos, mecanismos de ação e de resistência antimicrobiana.

Os antimicrobianos atualmente em uso clínico são, em sua maioria, os antibióticos naturais ou seus derivados sintéticos e podem ser classificados em: β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas etc). Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas. (GUIMARÃES et al., 2010).

2.5.2.1 β -lactâmicos

Grupo de antibióticos que possuem em seu núcleo estrutural um anel betalactâmico em comum, o qual confere atividade bactericida. As características da cadeia lateral definem seu espectro de ação e suas propriedades farmacológicas. (ANVISA, 2010). Seu mecanismo de ação é interferir com a síntese da parede celular por acoplarem-se ao receptor desta parede e impedirem a transpeptidação que permite a firme ancoragem do tetrapeptídeo às moléculas de polissacarídeos, levando a perda da rigidez da camada de peptidoglicano e com isso, à morte celular. (NUSSBAUM et al., 2006; SUARÉZ; GUDIOL, 2009).

São representados pelas penicilinas, divididas em penicilinas naturais ou benzilpenicilinas (penicilina G, penicilina V); penicilinas resistentes às penicilinases (metilcilinas, oxacilina), e aminopenicilinas (amoxicilina e ampicilina), cefalosporinas (de 1ª, 2ª, 3ª e 4ª geração), carbapenens, oxapeninas e monobactâmicos. O principal mecanismo de resistência antimicrobiana é a inativação do antibiótico por enzimas que clivam o anel betalactâmico. (GUIMARÃES, 2010).

2.5.2.2 Aminoglicosídeos

O primeiro aminoglicosídeo conhecido foi a estreptomicina obtida a partir do fungo *Streptomyces griseus*. Esse grupo de antibióticos é quimicamente constituído por dois ou mais aminoaçúcares unidos a um núcleo hexose por ligação glicosídica. Seu mecanismo de ação consiste na indução de uma leitura defeituosa do mRNA no sítio peptidil (P) do ribossomo levando à síntese de proteínas anômalas e, portanto, afuncionais, apresentam efeito bactericida devido à alta afinidade dos aminoglicosídios pelas proteínas da subunidade 30S do ribossomo. As principais drogas dessa classe são: estreptomicina, gentamicina, canamicina, amicacina e tobramicina entre outros. Sua atuação depende da ligação à superfície da célula bacteriana e posterior transporte através da parede por um processo dependente de energia oxidativa. (CRF-SP, 2011).

São antimicrobianos usados principalmente no tratamento de pacientes com infecções graves causadas por bactérias gram-negativas aeróbias, sendo ineficazes contra anaeróbios. Os mecanismos de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos consistem em: alteração dos sítios de ligação no ribossomo, alteração na permeabilidade e modificação enzimática da droga e são codificados por genes em geral associados a plasmídeos conjugativos e não conjugativos e em transposons, e parecem ser constitutivos, não sendo induzidos pela presença do antimicrobiano. (ANVISA, 2010).

2.5.2.3. Macrolídeos

Grupo de antimicrobianos quimicamente constituídos por um anel macrocíclico de lactona, ao qual ligam-se um ou mais açúcares. Pertencem a este grupo azitromicina, claritromicina, eritromicina, espiramicina, miocamicina, roxitromicina, entre outros. A eritromicina foi o primeiro macrolídeo isolado a partir de *Streptomyces erythreus*. São agentes bacteriostáticos, que atuam pela ligação com o RNA ribossomal 23S da subunidade 50S, interferindo na elongação da cadeia peptídica durante a translação e bloqueando a biossíntese de proteínas bacterianas. (NUSSBAUM et al., 2006). A resistência pode surgir por: diminuição da permeabilidade da célula ao antimicrobiano, alteração no sítio receptor da porção 50S do ribossomo e inativação enzimática. (ANVISA, 2010).

2.5.2.4 Cloranfenicol

Isolado pela primeira vez a partir do micro-organismo *Streptomyces venezuela*. Atualmente o cloranfenicol é sintetizado artificialmente. Seu mecanismo de ação é de inibição da síntese proteica através de ligação à subunidade 30S do ribossomo e inibição do movimento dos ribossomos ao longo do mRNA, provavelmente pela inibição da peptidil transferase, responsável pela extensão da cadeia peptídica. (GUIMARÃES, 2010). Mais frequentemente, a resistência é determinada pela produção de uma enzima, acetiltransferase ou nitrorredutase, que inativa o composto, ou ocorre também por alterações na permeabilidade da droga. (ANVISA, 2010).

2.5.2.5 Tetraciclínas

Antimicrobianos de amplo espectro de ação, sendo eficazes contra Gram-positivos, Gram-negativos aeróbios e anaeróbios, espiroquetas, rickétsias, micoplasmas, clamídias e alguns protozoários (ANVISA, 2010).

São inibidores específicos da síntese proteica, bloqueiam o receptor na subunidade 30S que se liga ao t-RNA durante a tradução gênica não permitindo a ligação do peptídeo - tRNA ao sítio A. Sua ação é reversível e, por isso são agentes bacteriostáticos. (TAVARES, 2001).

O principal mecanismo de resistência é por diminuição da acumulação da droga no interior da célula. Pode ser relacionada a genes cromossômicos, plasmidiais ou presentes em transposons. (TAVARES, 2006).

2.5.2.6 Lincosaminas

Inicialmente isoladas a partir do *Streptomyces lincolmsis*, originando a lincomicina, posteriormente, modificações químicas produziram a clindamicina. Suas propriedades antibacterianas são similares às dos macrolídeos e agem pelo mesmo mecanismo de ação. Isto é, atuam por inibição da síntese proteica nos ribossomos, ligando-se a subunidade 50S, sendo, portanto, bacteriostáticas. O mecanismo de resistência é por alterações no sítio receptor do ribossomo e por mudanças mediadas por plasmídeos, no RNA 23S da subunidade 50S do ribossomo. (ANVISA, 2010).

2.5.2.7 Quinolonas e fluorquinolonas

Importante classe de antimicrobianos sintéticos com atividade bactericida, que atuam contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo muito efetivas nas infecções do trato urinário causadas por *E. coli*. O ácido nalidíxico, uma das primeiras quinolonas, foi o protótipo para o desenvolvimento das fluorquinolonas. Atuam sobre a enzima DNA girase, interrompendo a reprodução celular. São representados pelo ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina e gemifloxacina. (ANVISA, 2010).

O principal mecanismo de resistência antimicrobiana é a bomba de efluxo e a presença de um gene plasmidial que reverte a inibição da DNA girase. (JACOBY, 2005). Em 2006, foi encontrado um gene de resistência às quinolonas mais versátil, capaz de acetilar aminoglicosídeos, além de ciprofloxacina e norfloxacina.

2.5.2.8.Sulfonamidas

São quimioterápicos bacteriostáticos, com estrutura similar ao ácido para-aminobenzóico, precursor do ácido fólico. Inibem a produção de ácido fólico por mecanismo competitivo. São representados pela sulfanilamida, sulfisoxazol, sulfacetamida, ácido para-aminobenzóico, sulfadiazina e sulfametoxazol, sendo as duas últimas de maior importância clínica. O cotrimoxazol é uma associação de sulfametoxazol com trimetropim (diaminopirimidina), drogas com efeito sinérgico pois atuam em duas etapas diferentes da síntese do ácido fólico, necessário para a síntese de ácidos nucleicos. O principal mecanismo de resistência às sulfas é a produção aumentada de ácido para-aminobenzóico pela célula bacteriana ou a síntese de diidropteróico sintetase que apresentam pouca afinidade pelo antimicrobiano, essa resistência é geralmente codificada por genes plasmidiais, outro mecanismo é a diminuição da permeabilidade da bactéria. Enquanto a resistência ao

trimetropim pode ocorrer por alteração da permeabilidade celular, por perda da capacidade da bactéria de ligação à droga, esta resistência por ser conferida cromossomicamente, por plasmídeos ou por transposons. (ANVISA, 2010).

2.5.3. Resistência antimicrobiana: considerações sobre suas origens

A resistência antimicrobiana é reconhecida atualmente como uma das maiores ameaças da humanidade e, embora não seja um fenômeno recente, é um problema crítico de saúde hoje em dia. Durante várias décadas e, em diferentes níveis, as bactérias responsáveis por infecções comuns desenvolveram resistência a cada novo antimicrobiano criado. Com a globalização, a disseminação de micro-organismos resistentes é rápida e atinge o mundo todo. (WHO, 2012; THEURETZBACHER, 2013).

Este problema se agrava com a escassez de novas drogas antimicrobianas no mercado. Desta forma, já existem micro-organismos para os quais não existem drogas efetivas, o que consiste em um dos maiores desafios na maioria dos centros de saúde. Patógenos bem conhecidos, com alto impacto clínico incluem organismos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus sp.* Em contraste com esses micro-organismos que ainda podem ser tratados com os mais novos antimicrobianos, algumas bactérias Gram-negativas, especialmente *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* têm desenvolvido resistência à maioria, senão a todos os antibióticos atualmente disponíveis. (THEURETZBACHER, 2013).

Apesar do uso abusivo de antimicrobianos ser um dos fatores que mais contribuiu para o aumento da resistência, por exercer pressão de seleção em micro-organismos de relevância clínica, a resistência é conhecida desde o passado, antes mesmo do primeiro uso clínico dos antibióticos. (DAVIES; DAVIES, 2010). A grande variedade de genes envolvidos na resistência indica uma origem e evolução muito antigas, anterior à utilização clínica dos antimicrobianos (WRIGHT, 2007).

Elementos genéticos móveis estão presentes em alta frequência, principalmente na família *Enterobacteriaceae*, explicando a rápida evolução da resistência e, em particular, da multirresistência. Genes localizados em integrons e mobilizados por transposons ou plasmídeos podem ser transferidos, inclusive entre espécies bacterianas distintas. A facilidade de transferência horizontal é diretamente proporcional à similaridade do códon de uso preferencial entre integrons e o organismo receptor. Já está comprovado que esta similaridade, apesar de existir, não é suficiente para manter determinados genes em várias linhagens

bacterianas na ausência de um fator seletivo. Desta forma, a pressão de seleção mantém tais genes, a despeito de não haver similaridade suficiente entre seus códons para a fixação desses no genoma. Está amplamente documentado que os antimicrobianos representam fortes pressões seletivas sobre esses genes, determinando, assim, uma prevalência desses nos micro-organismos, superior ao que se poderia esperar na ausência do fator de seleção. Integrons classe I têm sido descritos como os principais mobilizadores de resistência à antimicrobianos entre as bactérias entéricas e, particularmente em *E. coli*. (DÍAZ-MEJÍA et al, 2008; DOMINGOS et al., 2009; DI CONZA; GUTKIND, 2010).

A prevalência de integrons classe I em *E. coli* é significativamente maior em ambientes ocupados ou modificados pela presença humana e, diminui à medida que se distancia de tais ambientes. A utilização de agentes antimicrobianos na saúde humana e animal como ferramenta terapêutica, além de sua utilização nas cadeias de produção de alimentos, bem como o uso profilático dessas substâncias na pecuária representa grande pressão de seleção. Presume-se que a pressão representada pela presença de antibióticos seleciona ou mantém integrons em *E. coli*. Essa ideia é suportada por análises evolucionárias mostrando múltiplas origens e aquisições de integrons por bactérias entéricas. (Yu et al., 2004; DI CONZA; GUTKIND, 2010; ROLAIN et al., 2012).

2.5.4 Principais mecanismos de resistência antimicrobiana

Micro-organismos presentes em um ecossistema compartilham o nicho com outros organismos produtores de substâncias antimicrobianas e co-evoluem na presença destas. Assim, podem sobreviver ou até mesmo utilizar essas substâncias como substrato. Micro-organismos que coabitam esses ambientes apresentam resistência intrínseca ou natural. Pode ser devida também ao mecanismo de ação do antimicrobiano atuar sobre uma estrutura que a célula bacteriana não apresenta, como, por exemplo, penicilinas sobre micoplasmas (OCHMAN, 2000; WRIGHT, 2007).

Além disso, pode ser adquirida por mutações em genes cromossomais, ou por recombinação genética que ocorre através dos processos de conjugação, na qual os genes são transferidos por plasmídeos; por transformação, através da absorção de DNA do meio e por transdução, quando os genes são mobilizados por fagos. A resistência também pode ocorrer por transposição, isto é, por transposons. (CUNHA, 1998; JACOBY, 1998).

Os mecanismos básicos de resistência antimicrobiana são: inativação do antibiótico por enzimas bacterianas; modificação do alvo, ou sítio de ação que leva à perda de sensibilidade ao antibiótico; alterações na bomba de efluxo e permeabilidade externa da

membrana que promovem a redução da concentração do antibiótico sem sua modificação química; transmissão do alvo – algumas bactérias alteram suas vias metabólicas, tornando-se insensíveis aos antimicrobianos que atuam nessas vias. (TAVARES, 2001; WRIGHT, 2005).

2.5.5 Betalactamases; resistência ampliada aos betalactâmicos – *ESBL* (*Extended Spectrum B-lactamase*) e detecção fenotípica de cepas *ESBL*

Betalactamases são enzimas que hidrolisam o anel lactâmico dos antimicrobianos betalactâmicos, inativando-os (KONEMAN, et al., 1999). O sistema de classificação de Amber descreve quatro classes de lactamases, segundo a semelhança entre as cadeias de aminoácidos das enzimas, são elas: betalactamases de classe A, que compreendem as betalactamases clássicas e as de espectro estendido (*ESBL*); classe B, composta por metalo-betactamases e, classe C, representada pelas betalactamases cromossômicas. (JACOBY, 2009).

As betalactamases clássicas são produzidas pela maioria dos bacilos Gram-negativos hospitalares. São codificadas por genes plasmidiais e são resistentes às penicilinas de amplo espectro e às cefalosporinas de primeira geração, porém são sensíveis aos inibidores de lactamases como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam. As mais comuns são as enzimas TEM-1 e SHV-1. (SILVA; SALVINO, 2000).

Betalactamases de espectro estendido são produzidas por qualquer bacilo Gram-negativo, sendo *Klebsiella sp.* e *E. coli* as mais frequentes. Presentes em integrons classe I, normalmente mobilizados por plasmídeos conjugativos ou transposons. Atualmente são conhecidas cerca de 500 enzimas diferentes, sendo as mais comuns: SHV-2 e CTX-M-1. São resistentes a todas as cefalosporinas (1ª, 2ª, 3ª e 4ª gerações) e ao aztreonam (monobactâmico) e são sensíveis aos inibidores de betalactamases. A resistência *ESBL* em *Enterobacteriaceas*, principalmente em *E. coli*, representa um dos mais relevantes mecanismos de resistência. Em bactérias Gram-negativas, as lactamases acumulam-se no espaço periplasmático, o que aumenta a chance de atingir o antimicrobiano em concentrações elevadas. Bactérias Gram-positivas enviam essas enzimas para fora da parede celular, difundindo-as para o meio e, portanto, atingem menores concentrações. Desta forma, em Gram-negativas essa resistência causa um maior impacto. Além disso, *E. coli ESBL* positivas, geralmente, carregam genes de resistência às quinolonas, aminoglicosídeos e tetraciclinas no mesmo cassete gênico, sendo portanto, multirresistentes. (OLIVEIRA et al., 2009; LOPES, 2010).

As metalo-betactamases hidrolisam todos os betalactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, porém não hidrolisam o aztreonam. Têm sido detectadas nos gêneros

Klebsiella, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. Não são inibidas pelos inibidores de betalactamases, somente são inibidas por substâncias quelantes como EDTA e derivados de tióis. Na classe C, estão as lactamases cromossômicas (AmpC) que são produzidas por desrepressão de genes, sendo os betalactâmicos mais indutores de desrepressão a cefoxetina e o imipinem. São resistentes aos inibidores clavulanato, sulbactam e tazobactam e, por isso, não se classificam como ESBL, apesar da capacidade de hidrolisar quase todas as cefalosporinas. É constitutiva em *Pseudomonas aeruginosa* e adquirida em bacilos Gram-negativos como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Providencia*. (FONTES et al., 2011).

A detecção do fenótipo *ESBL* necessita da adoção de um protocolo específico de antibiograma, pois apesar da aparente sensibilidade *in vitro* a vários antimicrobianos betalactâmicos, após o início da terapia antimicrobiana pode ocorrer falha terapêutica com o início da produção de betalactamases de espectro ampliado, pois a velocidade de produção dessas enzimas varia segundo os tipos de enzimas apresentados pela cepa. Desta forma, as *ESBL* derivadas da enzima TEM, com apenas uma substituição na cadeia de aminoácidos (TEM-7 ou TEM-12), podem não ser detectadas em antibiogramas de rotina devido ao seu baixo poder de hidrólise. Os protocolos atualmente disponíveis para detectar fenotipicamente cepas *ESBL* positivas são: o método da fita E-teste (fita dupla); o método da dupla difusão em ágar ou método de aproximação de disco; o método da adição de ácido clavulânico ao disco de ceftazidima e o método automatizado. No método da aproximação dos discos, em que os discos de cefalosporinas são colocados a 20 ou 30 mm de distância do disco do betalactâmico associado com o inibidor (clavulanato, sulbactam, tazobactam), o sinergismo entre o antimicrobiano testado e o inibidor, confirma a produção de *ESBL*. A zona de sinergismo é chamada de zona fantasma (Figura 1) (RAWAT; NAIR, 2010). Porém, quando há resistência ao betalactâmico cefoxetina e ao inibidor de betalactamase e sensibilidade à cefepima, infere-se resistência tipo AmpC e, portanto, não *ESBL*. (BUSH; JACOBY, 2010).



Figura 1 Testes fenotípicos para identificação de ESBL. A) ESBL E-test; B) teste do disco combinado; C) teste da aproximação de discos. CTX: cefotaxima; CLA: ácido clavulânico; CAZ: ceftazidima; CFT: ceftiofur; AMC: amoxicilina- ácido clavulânico; CPM: cefepime. Fonte: Silva; Lincopan, 2012.

2.5.6. Epidemiologia da resistência antimicrobiana

Genes determinantes de resistência, principalmente em combinação, e patógenos resistentes às múltiplas drogas estão se disseminando com velocidade sem precedentes. Somente nos E.U.A, micro-organismos resistentes a antimicrobianos causam mais mortes anuais que AIDS, doença de Parkinson, enfisema e homicídios juntos. Na Europa, ocorrem cerca de 25.000 mortes anuais devido às infecções por esses micro-organismos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que são gastos anualmente entre quatro a cinco bilhões de dólares e cerca de nove bilhões de euros, respectivamente nos E.U.A. e Europa em consequência de resistência antimicrobiana. (THEURETZBACHER, 2013).

Enterobacteriaceas *ESBL* positivas, resistência aos carbapenêmicos, resistência alarmante às fluorquinolonas e demais antimicrobianos usados no tratamento de infecções por *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Salmonella*, entre outros, estão se disseminando em altíssimas taxas (NORDMAN, et al., 2009; HO et al., 2010). As maiores causas estão relacionadas ao consumo errôneo de antimicrobianos, como por exemplo: uso de doses não terapêuticas, prescrições empíricas não embasadas em protocolos consistentes ou apoiados em dados epidemiológicos confiáveis, alteração na microbiota normal pelo uso de antimicrobianos levando à seleção de clones resistentes, além de, substituição, diminuição, ou até eliminação de micro-organismos da microbiota normal. (ANVISA, 2010). Estudos indicam que os efeitos do uso de antimicrobianos na microbiota intestinal, por exemplo, causam impactos por tempo mais prolongado do que o anteriormente suposto, podendo

permanecer por um período superior a quatro anos (ANTUNES et al., 2011). Segundo, Krumperman (1983) as frequências de isolamentos de bactérias resistentes às múltiplas drogas (MDR) são menores que 20% em ambientes onde os antibióticos são usados raramente e, afirma que taxas superiores a 20% indicam grande risco de exposição aos agentes antimicrobianos. Kiratisin e colaboradores (2008) responsabilizam, principalmente, a disseminação de genes *ESBL* em plasmídeos conjugativos pelos atuais altos níveis de multirresistência entre os micro-organismos. Em *E. coli*, por exemplo, as cepas *ESBL* positivas apresentam níveis de multirresistência muito superiores aos exibidos pelas cepas *ESBL* negativas. Ainda, a ampla distribuição dessas cepas pode estar ligada à sua transmissão entre hospitais, unidades de tratamento de águas residuárias e ambiente (KORZENIEWSKA et al., 2013).

Na América Latina, a primeira descrição de *ESBL* foi feita no Chile, sendo reportada a presença de SHV-5 em *K. pneumoniae* (GUTHMANN et al., 1989 apud SILVA; LINCOPAN, 2012). Na década de 90, outra família de lactamases foi identificada, a CTX-M, produzidas por cepas clínicas encontradas em vários países, como Alemanha, França, Japão, Argentina e Brasil. (BAUERNFEIND, 1996; BONNET et al., 2000).

Apesar da ocorrência de cepas *E. coli ESBL* positivas no Brasil ser alta, faltam dados epidemiológicos oficiais e compilados rotineiramente, uma vez que o país não dispõe de um programa de vigilância epidemiológica da resistência antimicrobiana. Cepas *ESBL* de origem hospitalar têm sido relatadas com frequência no Brasil, especialmente as portadoras de enzimas da família CTX-M. Entretanto, o surgimento de cepas com esse fenótipo de origem ambiental, comunitária, em alimentos de origem animal (SILVA et al., 2010) e em animais de estimação, principalmente cães e gatos (CARATTOLI et al., 2005; MURPHY et al., 2009) têm demonstrado a complexidade em se estabelecer a origem desta resistência. (SILVA; LINCOPAN, 2012).

2.6 Resistência antimicrobiana em cepas de *E. coli* isoladas de animais de companhia

Estudos apontam o crescimento exponencial e alarmante da resistência antimicrobiana observado na família *Enterobacteriaceae* como um dos maiores problemas clínicos atuais, tanto nas unidades de saúde humana quanto veterinária. O surgimento de genes de resistência ampliada aos beta-lactâmicos (*ESBL*), aos carbapenêmicos, às fluorquinolonas e demais antibióticos usados no tratamento de infecções por enterobactérias, especialmente por *E. coli*, constituem grave problema. Já são relatadas algumas cepas desta bactéria para as quais os antibióticos atualmente disponíveis não são eficazes. (THEURETZBACHER, 2013).

A resistência antimicrobiana em cepas de *E. coli* isolada de animais domésticos vem sendo observada há longo tempo, estando principalmente relacionada ao crescente consumo de antibióticos (GRAVE et al., 1999; SANDERS; SANDERS, 1992; WARREN et al., 2001; SANCHEZ et al., 2002). Agentes antimicrobianos como penicilinas, cefalosporinas e fluorquinolonas têm sido largamente usados na clínica médica veterinária (GUARDABASSI et al., 2004; DAVIS et al., 2011; WAGNER et al., 2014), refletindo-se em grande pressão de seleção tanto nos patógenos alvos, como em bactérias da microbiota intestinal como *E. coli* (SZMOLKA; NAGY, 2013).

Além de *E. coli* resistente a antimicrobianos presente na microbiota intestinal de animais de companhia saudáveis (AUTHIER et al., 2006; PAULA; MARIN, 2008; COSTA et al., 2008), recentemente foram relatados isolamentos de cepas resistentes desta bactéria em outros sítios corporais, como boca e útero de cadelas com piometra (AGOSTINHO et al., 2013), assim como pele, boca e nariz de cães e gatos saudáveis (DAVIS et al., 2011), representando potencial de disseminação para humanos que entram em contato rotineiro com estes animais.

2.7 Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções por *E. coli* resistente a antimicrobianos na saúde humana.

O impacto clínico global da resistência antimicrobiana em cepas de *E. coli* é muito grande, ultrapassando em importância clínica bactérias que apresentam taxas ainda maiores de resistência, como *Klebsiella pneumoniae*, por exemplo. A relevância clínica de cepas de *E. coli* resistentes é atribuída às infecções do trato urinário nosocomiais ou adquiridas na comunidade, às severas infecções hospitalares e por apresentar consideráveis reservatórios em animais e no ambiente. (LIVERMORE, 2012).

O mecanismo de resistência mais relevante em *E. coli* é a produção de *ESBL*, pois tais cepas podem hidrolisar qualquer betalactâmico, com exceção dos carbapenêmicos e das combinações com inibidores de betalactamases. Além disso, tais cepas apresentam concomitantemente outros determinantes de resistência, como para fluorquinolonas, aminoglicosídeos e tetraciclinas. Fenótipos de multirresistência entre cepas *ESBL* positivas podem alcançar taxas superiores a 80%. (SIMNER et al., 2011). O uso exclusivo de fluorquinolonas para tratar infecções do trato urinário adquiridas na comunidade levou à perda de eficácia desse antimicrobiano contra *E. coli* na Europa, em uma velocidade sem precedentes (EARS-Net 2008).

Em estudo de vigilância conduzido na Europa, em 2012, a maioria das cepas de *E. coli* foram resistentes a, no mínimo, um dos grupos de antimicrobianos sob investigação. Resistência às aminopenicilinas foi observada em mais de 50% dos isolados, seguida pela resistência às quinolonas e às cefalosporinas de terceira geração. Entre esses últimos, muitos foram *ESBL*-positivos além de apresentarem resistência a outros grupos de antimicrobianos. Neste contexto, particularmente preocupante é o aumento da resistência às cefalosporinas de terceira geração, aos aminoglicosídeos e resistência combinada aos três mais importantes grupos de antimicrobianos, para os quais a maioria dos países desse continente relatou aumento significativo de resistência.

O aumento nas frequências de *E. coli ESBL* positivas associada à resistência às quinolonas restringe as opções terapêuticas para as infecções causadas por cepas deste micro-organismo, o que torna necessário lançar uso de carbapenêmicos nessas terapias. Tal situação pode contribuir para maior prevalência da resistência a esse importante antimicrobiano, em geral reservado para as infecções de maior gravidade. (ECDC, 2011).

A disseminação de cepas *E. coli ESBL* positivas pelo mundo tem sido notificada, ocorrendo em taxas que variam entre 10 a 30% e acima de 30%, em função de diferenças geográficas. Desta forma, no Brasil e em parte da América do Sul essas taxas variam entre 10 a 30%, assim como em alguns países da Europa. Enquanto, na América Central, algumas regiões da África e Ásia *E. coli ESBL* positiva ocorre em níveis acima de 30%. (THEURETZBACHER, 2013).

A constante vigilância da resistência antimicrobiana é fundamental para o controle de sua disseminação. Entretanto, em muitos países, faltam dados oficiais e confiáveis sobre os níveis dessa resistência. (GRUDMANN et al., 2011).

No Brasil, por exemplo, não há compilação oficial dos casos de infecções por micro-organismos resistentes às múltiplas drogas. Desta forma, esses dados restringem-se aos trabalhos de grupos de pesquisadores e a informação permanece esparsa em sistemas locais. Além disso, o desenvolvimento das infecções hospitalares ou da comunidade por micro-organismos resistentes a antimicrobianos não é de notificação compulsória no Brasil. Portanto, a mortalidade devido a essas infecções não é conhecida. Desde 2009, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabeleceu normas e medidas para o monitoramento, controle e prevenção da resistência antimicrobiana e, a partir de 2010 uma portaria do mesmo órgão obriga a retenção de receitas médicas de vendas de antibióticos, como uma das medidas para a contenção do aumento da resistência antimicrobiana. (ANVISA, 2010).

2.8 Resistência antimicrobiana associada às unidades de assistência à saúde humana e a contaminação ambiental

As infecções nosocomiais, também conhecidas como infecções hospitalares e, mais recentemente, infecções associadas à assistência à saúde (IAAS) são as mais impactadas pela resistência antimicrobiana. No ano de 2011, 722.000 pessoas contraíram IAAS nos E.U.A., sendo mais da metade destas adquiridas fora das unidades de tratamento intensivo (UTI), local do hospital mais caracteristicamente relacionado a essas infecções. São a 7^a causa de morte naquele país, principalmente em decorrência de IAAS por micro-organismos resistentes, isso significa que morrem 205 pessoas, por dia, devido a essas infecções nos E.U.A. (MAGILL et al., 2014; CDC, 2014).

Atualmente, cepas com fenótipos de resistência típicos de isolados hospitalares têm sido encontradas em isolados clínicos da comunidade e, inclusive em comensais da microbiota de humanos e animais saudáveis (CARATTOLI et al., 2005; COSTA et al., 2008; MURPHY et al., 2009). O papel das instituições de saúde na disseminação de cepas resistentes para o ambiente ainda é muito pouco conhecido. Entretanto, a transmissão de *E. coli ESBL* positiva de resíduos hospitalares e municipais para a comunidade tem sido pesquisada, tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento. A maior parte dessas pesquisas tem focado no papel dos esgotos hospitalares (PRADO et al., 2008; YANG et al., 2009; MANSSOURI; ABASSI, 2010; CHANG et al., 2010; CHAGAS et al., 2011), nos tratamentos das águas residuárias de efluentes hospitalares (STORTEBOOM et al., 2010; HUANG et al., 2012; KORZENIEWSKA et al., 2013), e nos resíduos sólidos ou lixo hospitalar (MBONGWE et al., 2008; KOOLIVAND et al., 2012; TETLEH-QUARCOO et al., 2013).

O problema de contaminação ambiental com resíduos hospitalares é maior nos países em desenvolvimento, pois muitas vezes, esse lixo é descartado com o doméstico sem receber qualquer tratamento prévio, o que implica em grande risco para os trabalhadores municipais da coleta de lixo, o público e o ambiente (ZARCHI; VATANI, 2009; DAMANI et al., 2013). Além disso, o volume de lixo contaminado torna-se ainda maior, pois em algumas instituições de saúde este é descartado com o lixo não contaminado, sem uma seleção prévia, havendo a necessidade de aterros sanitários cada vez maiores (ASKARIAN et al., 2004; DA SILVA et al., 2005; DAMANI et al., 2012).

No Brasil, a Associação Brasileira de Engenharia Ambiental e Sanitária (ABES, 2000) estima que 70% das cidades brasileiras descarte o lixo doméstico e os resíduos médicos juntos, em lixões municipais, o que pode acarretar sérios problemas de saúde pública.

2.9 Resistência antimicrobiana associada às unidades de assistência à saúde veterinária e a contaminação ambiental

Assim como na medicina humana, na medicina veterinária também ocorrem as infecções hospitalares ou IAAS por micro-organismos resistentes e, isto deve ser assunto de medidas de controle. A contaminação ambiental com patógenos está largamente disseminada em hospitais e clínicas veterinárias e pode contribuir para a disseminação desses micro-organismos para a comunidade (TRAVERSE; ACETO, 2015). Infecções nosocomiais veterinárias causadas por bactérias resistentes podem aumentar a morbidade, os custos e a duração do tratamento e, ainda implicam em riscos de disseminação de zoonoses. (SUTHAR et al., 2014).

Muitos micro-organismos associados à IAAS humana também são encontrados nas unidades de assistência à saúde veterinária, tendo sido documentados, principalmente em hospitais-escolas veterinários, causando doenças em animais. Entretanto os dados de IAAS veterinária ainda são escassos. O desconhecimento da epidemiologia desse tipo de infecção torna-se ainda mais grave diante do alto nível de resistência antimicrobiana encontrada em cepas bacterianas isoladas de animais (LEONARD et al., 2012; LEITE-MARTINS, 2014). A possibilidade de compartilhamento dessas cepas com humanos, que convivem ou trabalham com esses animais, representa uma ameaça à saúde pública. Pois, além de micro-organismos causadores de doenças zoonóticas, outros, não patogênicos para humanos são prováveis reservatórios de genes de resistência que podem ser horizontalmente transferidos para micro-organismos da microbiota de humanos ou de outros animais (BOGAARD; STOBBERINGH, 2000; GUARDABASSI et al., 2004; MOYAERT et al., 2006; DAVIS et al., 2011).

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho, realizado com cepas de *E. coli* isoladas da pele do abdômen ou dorso, da boca, da genitália externa (vagina/prepúcio) e do reto de gatos saudáveis, originados de três populações que foram caracterizadas segundo a proximidade com unidades de assistência à saúde humana, veterinária, ou sem proximidade com esses locais, foram:

Isolar e identificar cepas de *E. coli* de diferentes sítios corporais de gatos saudáveis.

Testar as susceptibilidades das cepas isoladas frente a 17 agentes antimicrobianos

Verificar a presença do fenótipo de resistência *ESBL* entre os isolados.

Relacionar as frequências e perfis de resistência dos isolados com a origem da cepa, segundo o sítio corporal.

Identificar diferenças nos padrões e frequências de resistência destas cepas segundo a proximidade de seus hospedeiros com locais onde o uso de agentes antimicrobianos é rotineiro.

Caracterizar filogeneticamente as cepas isoladas.

Relacionar a classificação filogenética das cepas com suas origens segundo o sítio corporal e a população.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Breve caracterização da localidade de estudo

O Município de Ituverava está localizado na região nordeste do Estado de São Paulo, a 410 Km de distância da Capital, na região Sudeste do país. A altitude é de 631 metros e área de 727 km², a latitude sul é 20°20'30" e a longitude oeste é 47°47'30". A população é de 39.690 habitantes (IBGE, 2010).

Com relação à assistência à Saúde Pública Humana, a cidade conta com um Centro de Saúde (CSII), um Ambulatório de Especialidades Médicas (AME), um Centro de Atenção Psicossocial (CAPs), dois Hospitais e seis Postos de Saúde da Família (PSF).

A assistência à saúde veterinária é realizada pela iniciativa privada, sendo representada por um Hospital-Escola Veterinário e seis Clínicas Veterinárias particulares. (IBGE, 2010).

4.2 Coleta de amostras e isolamento de *Escherichia coli*

Durante 2014, foram colhidas amostras de abdômen, boca, dorso, genitália externa e reto de 65 gatos saudáveis de ambos os sexos, idades e raças diferentes, de animais catalogados em uma clínica veterinária em Ituverava, SP. Na época da pesquisa, os animais que não estavam recebendo tratamento para doenças ou não apresentavam sintomas clínicos de doenças foram escolhidos e designados como saudáveis. Entre esses, os animais com último uso de antibióticos há mais de 6 meses da data da coleta, foram escolhidos para amostragem. Foi perguntado aos tutores dos gatos pesquisados sobre a convivência com outros gatos ou espécies na mesma residência. Também foi solicitada informação sobre a possibilidade de acesso à rua pelo gato e, em caso afirmativo, se o acesso era esporádico (menor ou igual a uma vez ao dia e, por curtos períodos) ou irrestrito.

Esses gatos foram agrupados em três populações, segundo a proximidade ou não da residência do proprietário com locais onde o uso de antibióticos é rotineiro. Sendo estas: próximo à hospitais e centros de saúde municipais (CSH); próximo às clínicas veterinárias e pet shops (CSV) e sem proximidade com estes lugares (SMP), usando uma distância fixa de três quarteirões (aproximadamente 300m) em cada direção em volta destes lugares (área total = 282.600 m²). Animais cujos proprietários residiam na intersecção destas áreas não foram utilizados na pesquisa. A distância foi estabelecida segundo estudos etológicos sobre o territorialíssimo e a área de vida de gatos domésticos (BARRATT, 1997; MEEK, 2003; FERREIRA, 2011) (Figuras 2 e 3). As amostras foram colhidas do reto; vagina ou prepúcio; boca; dorso ou abdômen, ou seja, sítios corporais que podem entrar em contato com o reto

durante o comportamento natural de limpeza da espécie, e também em contato (direto ou indireto) com humanos. (Figuras 4 e 5). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais (CEUA) da Faculdade Dr. Francisco Maeda- FAFRAM e o consentimento do proprietário foi obtido para todos os gatos participantes.

De cada animal, as amostras da boca, reto e genitália externa (vulva ou prepúcio) foram colhidas usando swabs estéreis, previamente umedecidos com solução salina tamponada fosfatada estéril (1x). Enquanto, a coleta das áreas do abdômen e dorso foram realizadas utilizando-se gazes estéreis umedecidas com a mesma solução. As amostras foram transferidas para recipientes estéreis contendo 10 ml de água peptonada tamponada (1x) e incubadas por 24 horas a temperatura de 37°C.

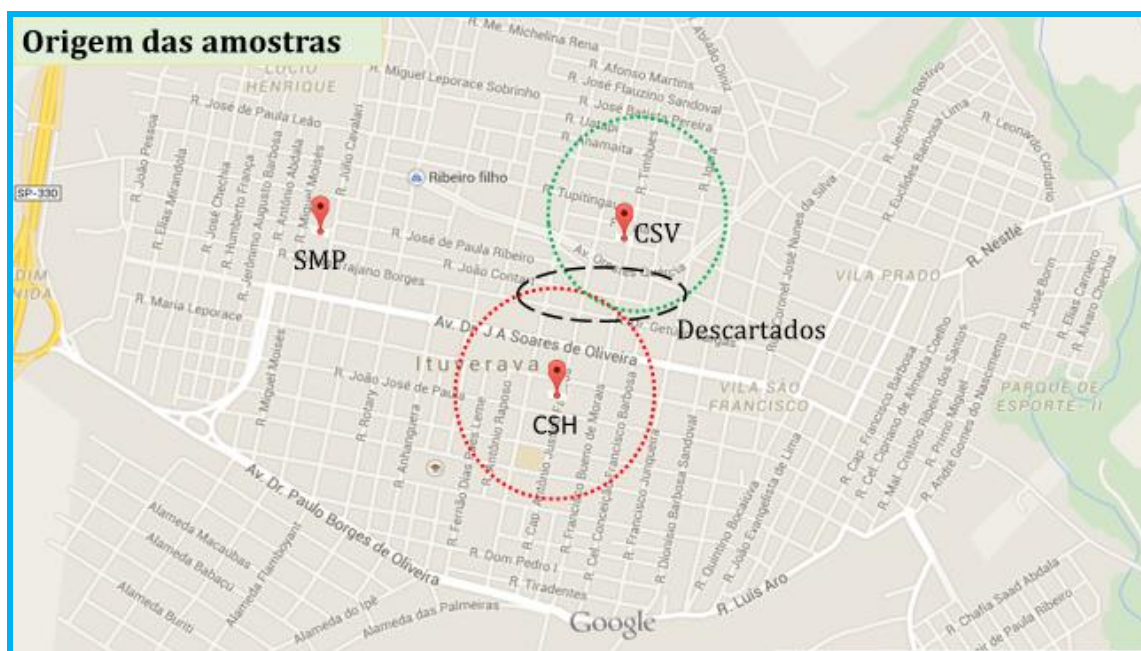


Figura 2 Áreas geográficas que delimitam as três populações de gatos caracterizadas segundo a distância com centros de saúde humana (CSH –círculo vermelho), centros de saúde veterinária (CSV–círculo verde), sem proximidade com esses locais (SMP- população sem proximidade), região de intersecção entre os centros de saúde humana e veterinária (círculo preto-animais não coletados).



Figura 3 Mapa da Cidade de Ituverava- SP, onde são destacadas as unidades de saúde humana (CSH-pontos vermelhos), unidades de saúde veterinária (CSV-pontos verdes) e a distribuição dos 65 gatos coletados, por endereço (pontos azuis).



Figura 4 Coleta da boca de gato doméstico através da utilização de swab estéril



Figura 5 Material utilizado para coleta e manutenção das amostras até a semeadura.

4.3 Identificação de *Escherichia coli*.

De cada meio de cultura enriquecido, 100 µl foram transferidos para agar HiCrome e incubados por 4 horas, a 37°C, e por mais 18 a 24h, a 44°C. Colônias representativas de *E. coli* de acordo com HiCrome agar, que apresentaram cor verde, (Figura 6 A) foram transferidas para ágar MacConkey (Oxoid, Hapshire, UK) e posteriormente incubadas a 37°C por 24 h. Duas colônias de cada placa com morfologia típica de *E. coli* foram selecionadas e examinadas com testes bioquímicos. (Figura 6 B).

Para os testes bioquímicos confirmatórios foram utilizados tubos contendo o meio de cultura RUGAI modificado com lisina (PESSOA; SILVA, 1972) incluindo os testes bioquímicos de indol, triptofano, glicose, sacarose, produção de gás, lisina, motilidade, ureia e H₂S (KONEMAN et al, 1997) (Figura 8). Foi utilizada a técnica de semeadura de picada até o fundo do tubo associada à técnica de estrias no ápice. Após 18 a 24 horas de incubação foram

feitas as leituras e interpretação dos resultados levando em conta a tabela de perfil bioquímico das enterobactérias (Figuras 9), de forma que: a prova da produção de indol foi observada no papel da face interna da tampa após a adição de uma ou duas gotas do reativo de Kovacs, sendo que o aparecimento da cor vermelha indica reação positiva e o não aparecimento, negativa. A desaminação do triptofanos (LTD) foi verificada observando-se a cor do ápice até a base da inclinação do meio, foi considerado positivo o aparecimento da cor verde garrafa (para organismos sacarose negativos) ou marrom (para sacarose positivo). A fermentação da sacarose foi observada entre o pico da inclinação até a base da mesma, o aparecimento da cor amarela indica reação positiva e o não aparecimento, reação negativa. A fermentação da glicose foi verificada entre a base da inclinação até a fase intermediária, e considerada positiva com o aparecimento da cor amarela no meio. A produção de gás foi observada entre a base da inclinação e a fase intermediária, aparecimento de bolhas ou o arredondamento do meio indica que a reação foi positiva e o não aparecimento, negativa. A presença de urease foi verificada entre a base da inclinação até a fase intermediária, sendo que o aparecimento da cor azul escura indica reação positiva e o meio inalterado, reação negativa. A produção de H_2S foi observada entre a base da inclinação até a fase intermediária, considerando o aparecimento da cor preta reação positiva e o não aparecimento, reação negativa. A descarboxilação da lisina foi verificada na fase inferior, com o aparecimento da cor púrpura indicando reação positiva e a cor amarela, reação negativa. A motilidade foi observada na face inferior, sendo que qualquer crescimento além da linha de picada foi considerado positivo.

Para complementar a identificação bioquímica foi realizada a prova do citrato através da semeadura, por estrias, na superfície de tubo inclinado em meio de cultura Citrato de Simons (DIFCO). Após a incubação do inóculo por 24 horas, a 37°C, foi observada se houve alteração do meio, sua permanência inalterada (sem mudança de cor) é indicativa de que não houve crescimento bacteriano, o que confirma *E. coli*, pois esta não possui a permease do citrato e, na ausência desta enzima, a bactéria não cresce quando esta é a única fonte de carbono disponível no meio. (EDWARDS; EWING, 1972).

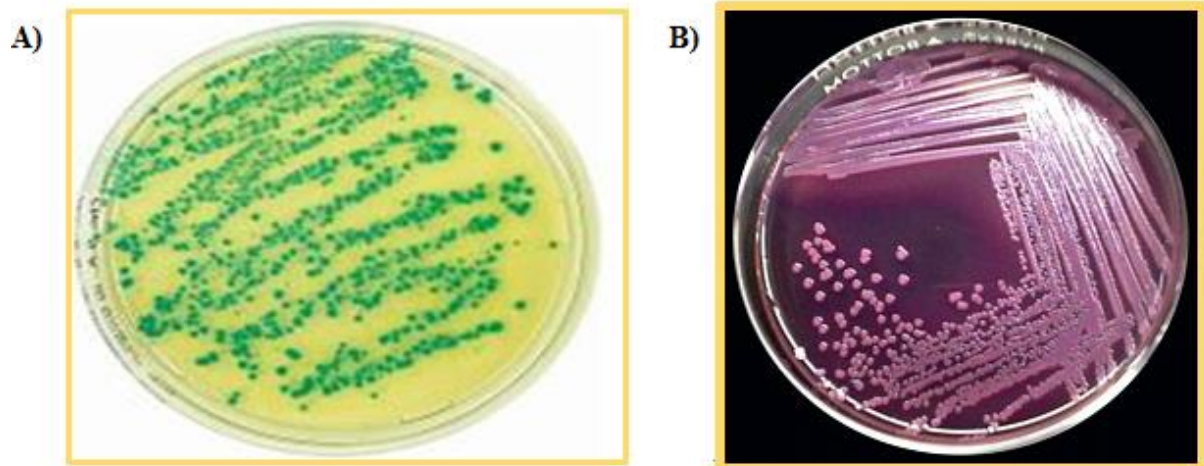


Figura 6 (A) Meio agar Hicrome semeado evidenciando as colônias de *E. coli* (verdes) (à direita); (B) Meio MacConkey, onde são visualizadas colônias róseas (lactoses positivas), de *E. coli*. (à esquerda).

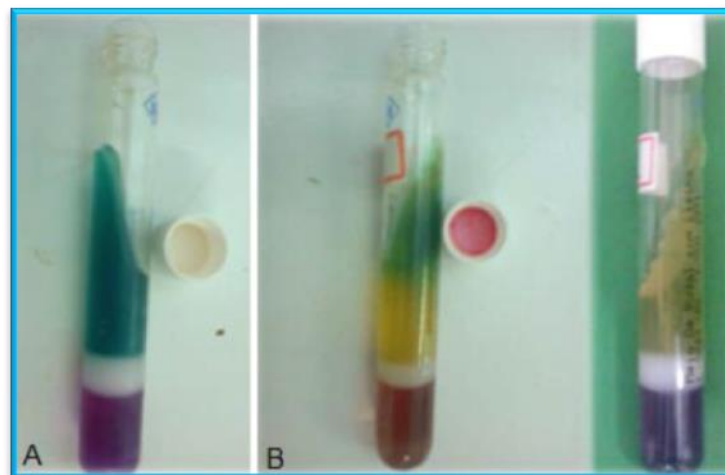


Figura 7 A) Inóculo em meio de Rugai modificado. B) Amostras positivas para *E. coli* sacarose positiva (à direita) e sacarose negativa (à esquerda).

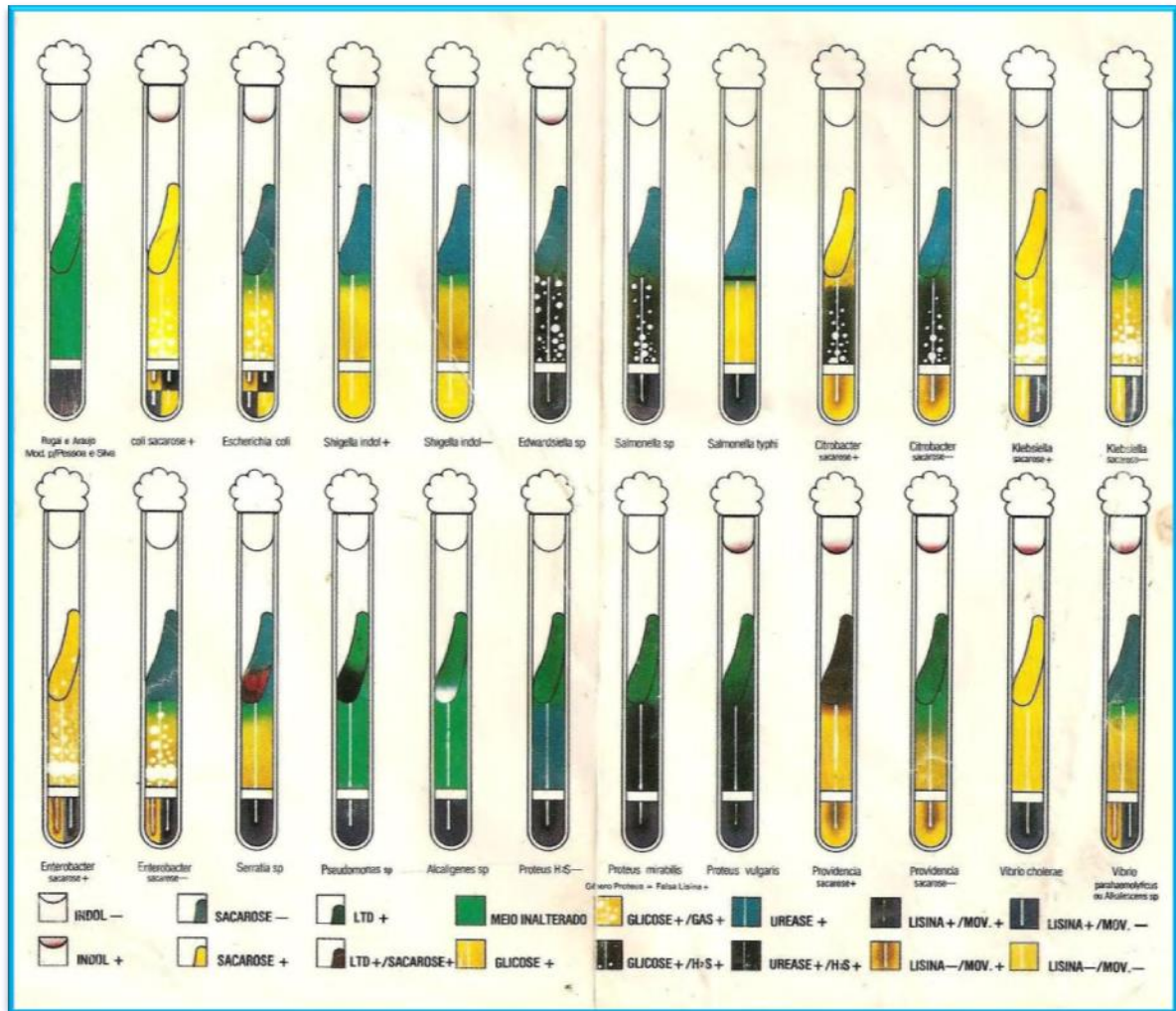


Figura 8 Identificação bioquímica de Enterobactérias contendo provas de Indol, LTD, sacarose, glicose, produção de gás, urease, H₂S, lisina e motilidade. Fonte: Cecon- Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico.

4.4 Testes de susceptibilidade antimicrobiana

A susceptibilidade dos isolados de *E. coli* foi verificada usando o método de difusão em disco como recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007). Aliquotas de colônias com crescimento de 24 horas foram suspensas em solução salina 0,9% formando uma solução com turvação de 0,5 de densidade de turvação segundo escala de McFarland (ORDEN et al., 2000). Esta suspensão foi semeada com o auxílio de *swabs* estéreis, em placas contendo agar Mueller-Hinton. Os discos contendo os antimicrobianos foram colocados de forma equidistante. A disposição dos antibióticos betalactâmicos foi feita segundo o indicado para a verificação de fenótipo de resistência *ESBL*. Dezesete agentes antimicrobianos (Cefar, São Paulo, Brasil) foram incluídos, sendo eles: amicacina (AMI,

30µg), amoxicilina-ácido clavulânico (AMC, 30 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), aztreonam (AZT, 30 µg), cefalotina (CFL, 30 µg), cefepime (CPM, 30 µg), cefoxetina (CFO, 30 µg), ceftazidima (CAZ, 30 µg), ceftriaxona (CRO, 30 µg), cefazolina (CFZ, 30 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), cotrimoxazol (COT, 25 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), ácido nalidíxico (NAL, 30 µg), nitrofurantoína (NIT, 300 µg), norfloxacina (NOR, 10 µg) e tetraciclina (TET, 30 µg). Uma cepa referência de *E. coli* ATCC 25922 foi usada para controle de qualidade. Após 16-18 h de incubação a 37°C, cada isolado foi classificado como sensível, intermediário ou resistente com base nos diâmetros da zona de inibição em volta dos discos, de acordo com as orientações do CLSI (2014). Para a análise dos padrões da susceptibilidade antimicrobiana dentro das amostras de animais individuais, resultados intermediários foram categorizados como sensíveis.

4.5 Detecção do Fenótipo de betalactamases de espectro estendido – *ESBL* (*Extended Spectrum Betalactamase*)

A identificação da produção de *ESBL* foi feita por testes de sinergia de duplo disco usando uma combinação de aztreonam (monobactâmico), cefoxetina, cefepime, ceftriaxona e ceftazidima (cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações) próximos à amoxicilina-ácido clavulânico (inibidor de betalactamases). Os testes foram efetuados de acordo com o critério estabelecido pelo CLSI (2007). A formação de halo de inibição dos betalactâmicos somente próximo ao disco contendo amoxicilina-ácido clavulânico (halo interno) e ausência ou diminuição do halo de inibição na região não associada a amoxicilina-ácido clavulânico (halo externo) é sugestivo de cepas produtoras de *ESBL*. Cepas que apresentaram esse comportamento foram testadas com amoxicilina não associada ao ácido clavulânico. Um aumento ≥ 5 mm do halo de inibição ao redor do disco contendo a associação de amoxicilina com ácido clavulânico quando comparada com amoxicilina sem ácido clavulânico foi considerado positivo para produção de *ESBL*.

4.6. Extração de DNA

A extração do DNA bacteriano foi realizada em 191 cepas de *E. coli* e, procedu-se da seguinte maneira: em um tubo de ensaio contendo 1 ml de meio de cultura Luria Broth (DIFCO) a *E.coli* isolada foi incubada a 37°C, sob agitação, por 12 horas. Depois transferida para um tubo eppendorf e submetida a 14.000 rpm em centrífuga Eppendorf, modelo 5415C, da Brinkmann Instruments. Inc. O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas ressuspensas em 500 µl de água Milli que é estéril e agitadas em vortex por 30 segundos. O

processo de lavagem foi repetido 1 vez com 250 µl de água MilliQ e, em seguida o tubo eppendorf foi colocado por 10 minutos em água fervente para lise da parede celular. Outra centrifugação a 14000 rpm foi efetuada durante 30 segundos, sendo então retirados 150 µl do sobrenadante. Este foi transferido para outro eppendorf e estocado como molde de DNA (DNA Template), sendo então conservado a -20°C até o momento do uso. (KESKIMAKI et al., 2001).

4.7 Determinação do grupo filogenético

A análise filogenética dos isolados de *E. coli* foi feita através da identificação dos genes *chuA*, *yjaA* e TspE4C2 com os oligonucleotídeos iniciadores e seguindo a árvore dicotômica, segundo proposto por Clermont et al., 2000. A classificação dos grupos filogenéticos foi baseada na combinação de *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2: A (*chuA*⁻, TspE4.C2⁻, *yjaA*^{-/+}), B1 (*chuA*2⁻, TspE4.C2⁺, *yjaA*2⁻), B2 (*chuA*⁺, TspE4.C2^{-/+}, *yjaA*⁺) e D (*chuA*⁺, TspE4.C2^{-/+}, *yjaA*⁻) como mostra a Figura 9.

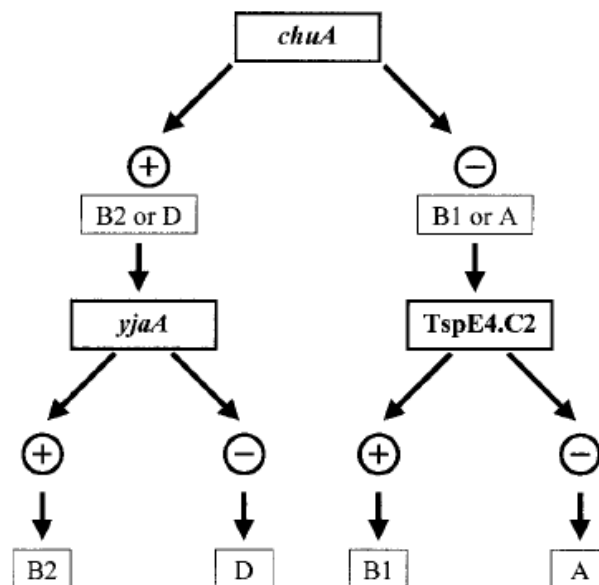


Figura 9 Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético de cepas de *E. coli*, utilizando os resultados da PCR dos genes *chuA*, *yjaA* e TSE4.C2.

4.8 Consumo de antimicrobianos na saúde humana, no Município de Ituverava, em 2014

As unidades de assistência à Saúde Pública Humana de Ituverava disponibilizaram informação sobre as quantidades totais de antimicrobianos (por agente antimicrobiano) utilizados em um período de 12 meses (2014), que foram usados para comparar com as

frequências de resistência antimicrobiana exibidas pelos isolados de *E. coli* do presente trabalho.

4.9 Análise estatística

Foram utilizadas as técnicas hierárquicas e não hierárquica (K-means) de estatística multivariada visando classificar os grupos para obter a máxima homogeneidade dentro dos mesmos e a máxima heterogeneidade entre eles, em termos das características (variáveis) analisadas. Para o método hierárquico foi utilizada a “medida de dissimilaridade euclidiana” como coeficiente de semelhança e, para identificar a similaridade entre os grupos foi utilizado o método de Ward. Todas as análises estatísticas foram efetuadas no programa STATISTICA versão 7.0 (Statsoft 2004).

5. RESULTADOS

Foram coletadas 325 amostras de 65 gatos, das quais foram obtidas 231 cepas de *E. coli*. A população estudada foi constituída por 37 fêmeas (57%) e 28 machos (43%), com as seguintes distribuições por faixa etária: gatos entre 5 e 11 meses de idade (17; 26%), entre 1 a 6 anos de idade (35; 54%) e acima de 7 anos (13; 20%). (Figuras 10 e 11). A amostra foi constituída, na maioria (41/65; 63%), por gatos que conviviam, na mesma residência, com outros gatos e espécies, sendo o cão a espécie mais frequente nessa associação. Foi verificado ainda que 11 gatos eram mantidos apenas com outros gatos (17%), 9 apenas com cães (14%), enquanto quatro animais viviam como únicos pets da residência. (Figura 12)

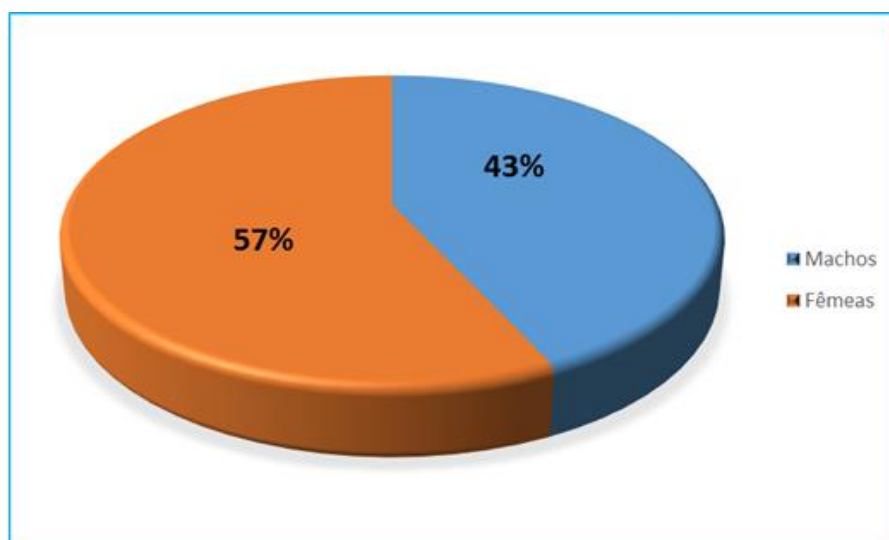


Figura 10 Distribuição dos sexos dos gatos coletados em Ituverava-SP, 2014.

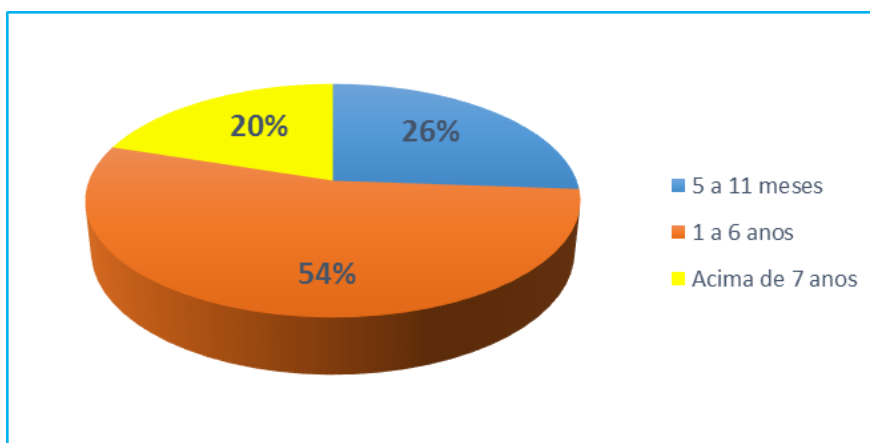


Figura 11 Distribuição, segundo a faixa etária, dos gatos coletados em Ituverava-SP, 2014.

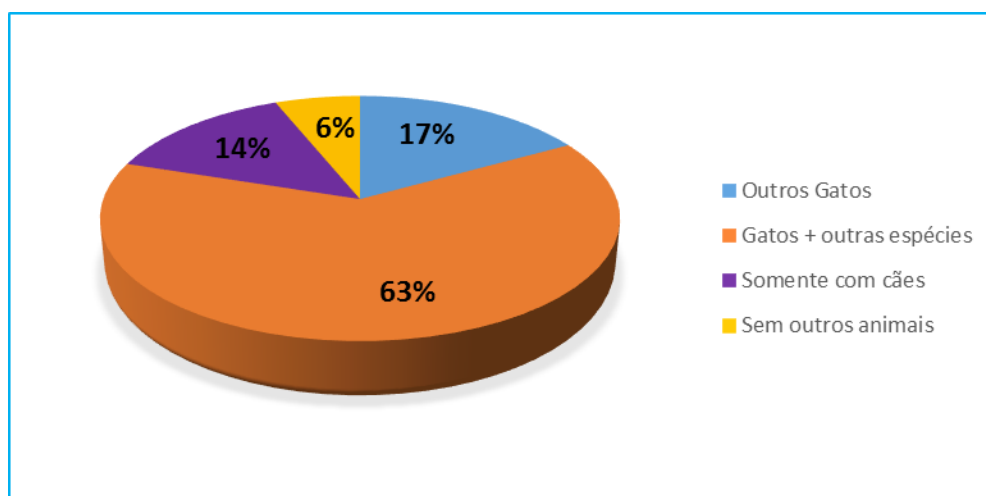


Figura 12 Distribuição dos gatos coletados quanto à convivência com outros gatos e/ou outras espécies, em Ituverava-SP, 2014.

Com relação ao acesso à rua, foi obtida informação junto ao tutor do gato, tendo sido encontrado que 30 gatos (46,1%) apresentavam acesso irrestrito à rua, enquanto 20 (30,8%), acesso esporádico (acesso com frequência menor ou igual a uma vez ao dia, por curtos períodos) e, 15 animais (23%) eram restritos à residência.

Em geral, foram obtidos seis isolados por gato, sendo três provenientes de swab retal e um de cada outro sítio corporal (boca, abdômen ou dorso e vagina ou prepúcio). As cepas provenientes do reto representaram 68,8% dos isolados, contribuindo com um total de 159 cepas. Em seguida, as cepas oriundas da genitália externa (vagina ou prepúcio) contribuíram com 16% dos isolados, tendo sido obtidas 37 cepas. As cepas provenientes da boca e as do abdômen ou dorso, apresentaram valores percentuais próximos, sendo respectivamente 7,8% (18 cepas) e 7,3% (17 cepas). (Figura 13).

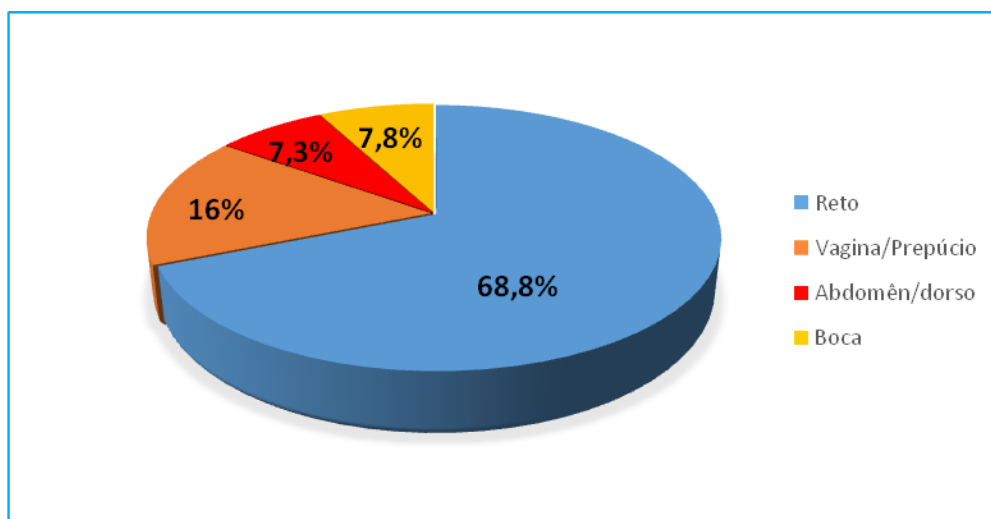


Figura 13 Distribuição das frequências de isolados de *E. coli* por sítio corporal dos gatos pesquisados, em Ituverava-SP, 2014

A distribuição das amostras baseada na região geográfica da residência dos proprietários mostrou como próximos à hospitais e centros de saúde humana (CSH) uma população formada por 23 gatos, dos quais foram obtidos 87 isolados. A população localizada perto de pet shops e clínicas veterinárias (CSV) foi formada por 17 gatos que contribuíram com 59 isolados e, a população de gatos cujas residências não apresentavam proximidade com esses locais (SMP) foi composta por 25 animais dos quais foram obtidos 85 isolados. (Figura 14).

Tabela 1 Distribuição dos isolados pan-susceptíveis de *E. coli* (n=89) em relação aos sítios corporais dos gatos pesquisados, segundo população de origem, em Ituverava-SP, 2014.

Origem*	Sítios corporais dos gatos Isolados (%)				
	Reto	Abdômen/dorso	Boca	Vagina/prepúcio	Total
CSH (n=87)	19 (21,8)	1 (1,1)	5 (6,0)	7 (8,0)	32 (36,8)
CSV (n=59)	14 (23,7)	1 (1,6)	2 (3,3)	5 (8,5)	22 (37,2)
SMP (n=85)	28 (33,0)	1 (1,2)	2 (2,3)	4 (5,0)	35 (41,2)

* População de gatos próxima aos centros de saúde humana (CSH); próxima a centros de saúde veterinária (CSV) e sem proximidade com esses locais (SMP).

Foi verificada resistência a todos os antimicrobianos testados, com exceção de amoxicilina-ácido clavulânico e norfloxacin, para os quais as 231 cepas foram susceptíveis.

Ampicilina foi o antimicrobiano que apresentou a maior frequência de resistência em cada uma das populações estudadas (43,3%), ocorrendo em 100, das 231 cepas. Altas frequências foram observadas para cefazolina 39,9% (92/231), cefalotina 33,8% (78/231), tetraciclina 31,6% (73/231) e cotrimoxazol 19,5% (45/231), enquanto para os outros antibióticos testados as resistências foram menores que 13%. (Tabela 2).

Observou-se grande diferença entre os isolados de *E. coli* para resistência à ampicilina, cefazolina e cefalotina quando comparadas a área de origem CSH (56,3%, 51,7 %, 46,0% respectivamente) com a área de origem SMP (28,2%, 38,8%, 28,2%, respectivamente). Também foram notadas diferenças nas frequências de resistência entre os isolados de CSV para cotrimoxazol (32,2%) quando comparados com CSH ou SMP (21,8%, 8,23%, respectivamente). (Tabela 2)

Tabela 2 Percentuais de resistência antimicrobiana em cepas de *E. coli* isoladas de gatos, segundo suas populações de origem, em Ituverava-SP, 2014.

Agente* antimicrobiano	Proximidade		
	Isolados (%)		
	Centro de Saúde Humana (n=87)	Centro de Saúde animal (n=59)	Sem Proximidade (n=85)
AMC	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
AMI	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (3,52)
AMP	49 (56.3)	27 (45.7)	24 (28.2)
ATM	3 (3.4)	1 (1.6)	11 (12.9)
CAZ	3 (3.4)	0 (0.0)	6 (7.0)
CIP	1 (1.1)	0 (0,0)	0 (0.0)
CFL	40 (46,0)	14 (23.7)	24 (28.2)
CFO	9 (10,3)	5 (8.5)	3 (3,52)
CFZ	45 (51,7)	14 (23.7)	33 (38,8)
CPM	2 (2.2)	1 (1.6)	2 (2.3)
CRO	3 (3,4)	2 (3.3)	5 (5.8)
SUT	19 (21,8)	19 (32.2)	7 (8,23)
GEN	0 (0.0)	1 (1.6)	4 (4.7)
NAL	14 (16.0)	4 (6.7)	5 (5.8)
NIT	9 (10.3)	3 (5.0)	6 (7.0)
NOR	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
TET	27 (31.0)	22 (37.2)	24 (28.2)

* amoxicilina-ácido clavulânico (AMC), amicacina (AMI), ampicilina (AMP), aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), cefalotina (CFL), ceftaxima (CFO), cefazolina (CFZ) cefepime (CPM), ceftriaxona (CRO), cotrimoxazol (SUT), gentamicina (GEN), ácido nalidíxico (NAL), nitrofurantoína (NIT), norfloxacina (NOR), tetraciclina (TET).

A distribuição das frequências de resistências entre as populações, verificada através de análise estatística multivariada, permitiu observar a formação de seis categorias de respostas. (Figura 15). Essas categorias, formadas em função das semelhanças nas respostas de resistência, formaram quatro agrupamentos de antimicrobianos: 1) cefazolina-cefalotina-tetraciclina-ampicilina; 2) nitrofurantoína-ácido nalidíxico-cefoxetina; 3) ceftriaxona-ceftazidima-gentamicina-cefepime-amicacina e 4) ciprofloxacina-norfloxacina-amicacina. As categorias 5 e 6 foram representadas pelos antimicrobianos cotrimoxazol e aztreonam, que apresentaram comportamentos únicos.

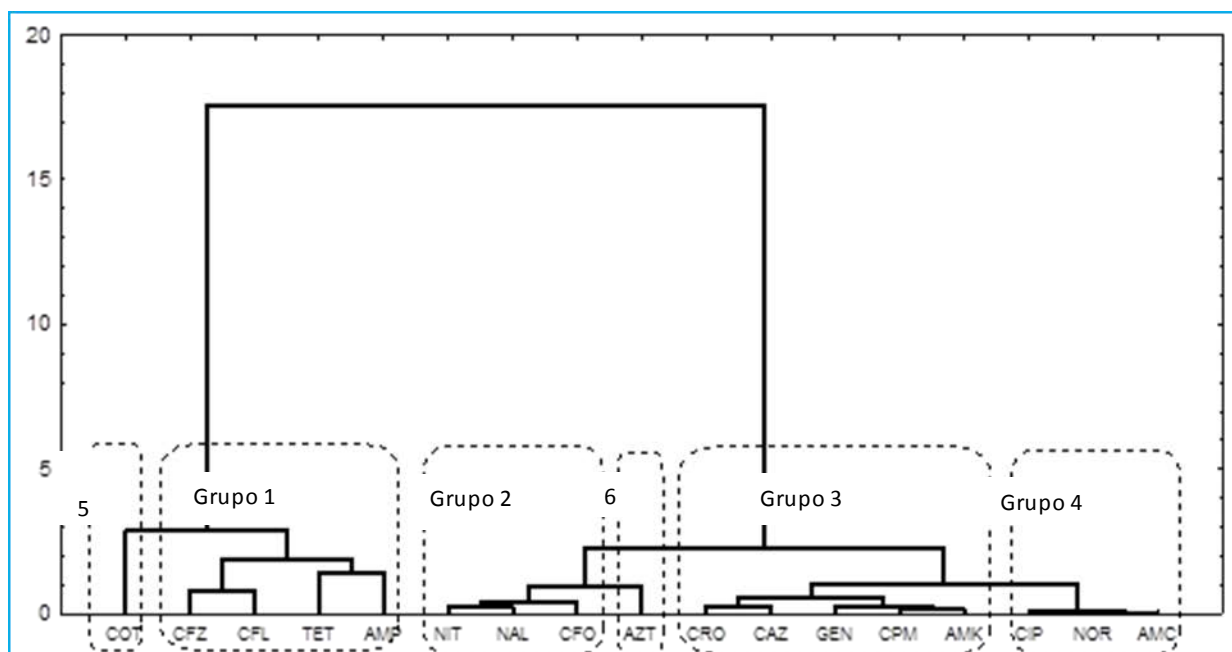


Figura 15 Análise de agrupamento hierárquico evidenciando a formação de grupos de antimicrobianos quanto à similaridade de suas frequências de resistência entre os isolados de *E. coli* de gatos domésticos, em Ituverava-SP, 2014.

Os padrões de comportamento dessas categorias variaram em função da população estudada. Sendo que, nitrofurantoína-ácido-nalidíxico-cefoxetina estiveram mais relacionados à população CSH; gentamicina-ceftriaxona-cefepime-amicacina estiveram mais relacionados à população SMP; ciprofloxacina-norfloxacina-amoxicilina-ácido clavulânico apresentaram comportamento semelhante para as populações CSH e CSV, sendo pouco relacionados à população SMP; enquanto resistências à cefazolina-cefalotina-tetraciclina-ampicilina foram mais relacionados às populações CSH e menos à população CSV, enquanto cotrimoxazol apareceu mais relacionado à essa população e aztreonam, mais relacionado à população SMP, (Figura 16).

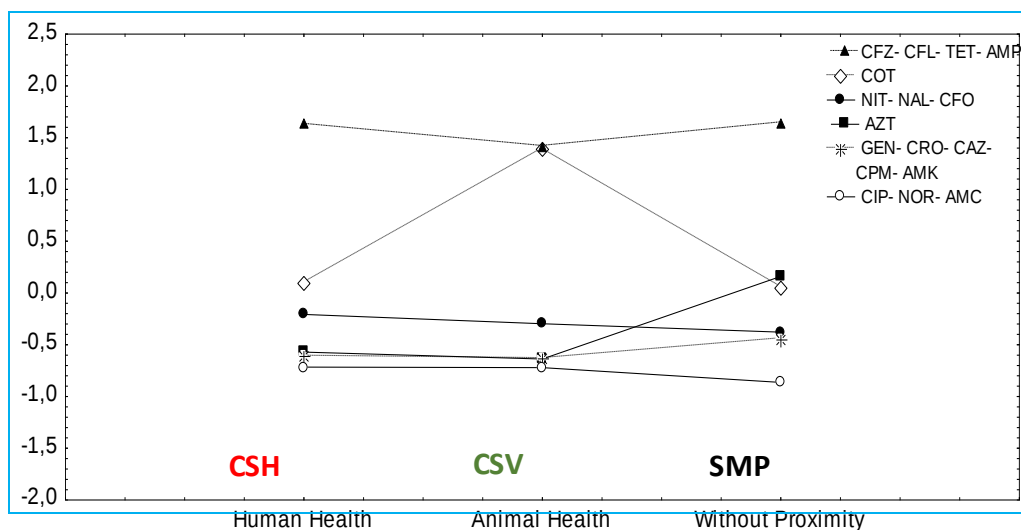


Figura 16 Análise de agrupamento não hierárquico (K-means) evidenciando as respostas de resistências dos grupos de antimicrobianos para os isolados de *E. coli* dos gatos domésticos, em função da população de origem (CSH-Centro de Saúde Humana; CSV-Centro de Saúde Animal e SMP-Sem Proximidade com esses locais), em Ituverava-SP, 2014.

A Tabela 3 mostra as frequências de resistências dos isolados de *E. coli* em relação aos sítios corporais. Maiores resistências foram observadas para ampicilina em todos os sítios corporais pesquisados, sendo que as cepas da genitália externa e do reto apresentaram as maiores frequências, 51,3% e 44,6% respectivamente. As maiores frequências de resistência à tetraciclina foram observadas para as cepas da genitália externa. A Figura 17 representa a prevalência da resistência, a cada antimicrobiano testado em relação ao sítio corporal.

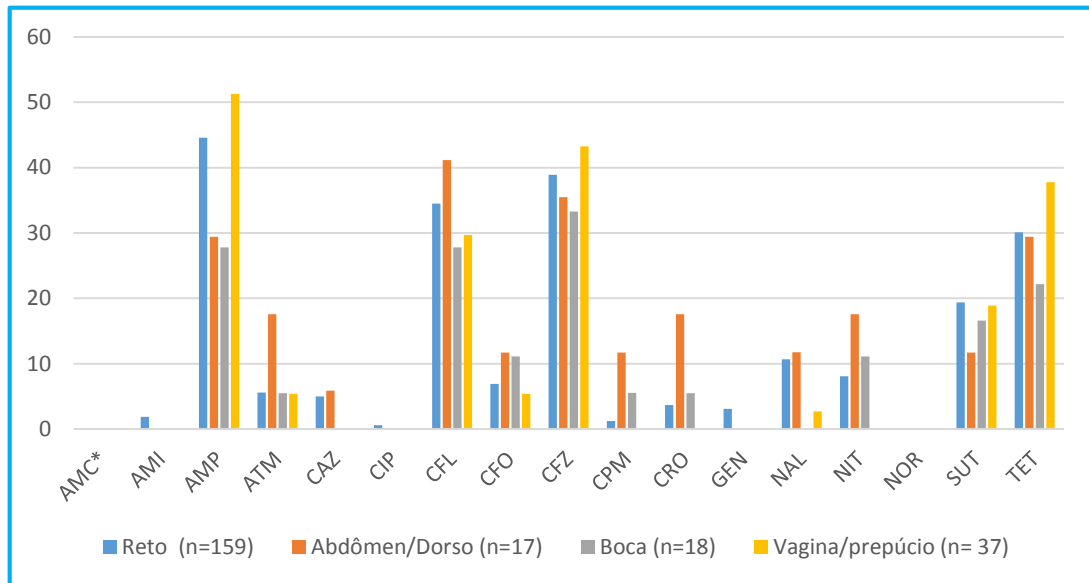


Figura 17 Representação da prevalência da resistência de cada antimicrobiano testado em relação aos sítios corporais de gatos, em Ituverava –SP, 2014. * amoxicilina-ácido clavulânico (AMC), amicacina (AMI), ampicilina (AMP), aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), cefalotina (CFL), cefoxitina (CFO), cefazolina (CFZ) cefepime (CPM), ceftriaxona (CRO), cotrimoxazol (SUT), gentamicina (GEN), ácido nalidíxico (NAL), nitrofurantoína (NIT), norfloxacin (NOR), tetraciclina (TET).

Tabela 3 Percentuais de resistências de *E. coli* isoladas de diferentes sítios corporais de gatos, em Ituverava-SP, 2014.

Agentes Antimicrobianos*	Sítios Corporais Percentuais %			
	Reto (n=159)	Abdômen/Dorso (n=17)	Boca (n=18)	Vagina/prepúcio (n= 37)
AMC	0,0	0,0	0,0	0,0
AMI	1,9	0,0	0,0	0,0
AMP	44,6	29,4	27,8	51,3
ATM	5,6	17,6	5,5	5,4
CAZ	5,0	5,9	0,0	0,0
CIP	0,6	0,0	0,0	0,0
CFL	34,5	41,17	27,8	29,7
CFO	6,9	11,7	11,1	5,4
CFZ	38,9	35,5	33,3	43,24
COM	1,25	11,7	5,55	0,0
CRO	3,7	17,6	5,5	0,0
GEN	3,1	0,0	0,0	0,0
NAL	10,7	11,76	0,0	2,7
NIT	8,1	17,6	11,1	0,0
NOR	0,0	0,0	0,0	0,0
SUT	19,4	11,7	16,6	18,9
TET	30,1	29,4	22,2	37,8

* amoxicilina-ácido clavulânico (AMC), amicacina (AMI), ampicilina (AMP), aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), cefalotina (CFL), cefoxitina (CFO), cefazolina (CFZ) cefepime (CPM), ceftriaxona (CRO), cotrimoxazol (SUT), gentamicina (GEN), ácido nalidíxico (NAL), nitrofurantoína (NIT), norfloxacina (NOR), tetraciclina (TET).

Entre os isolados de *E. coli* resistentes foram observados 61 padrões de fenótipos, cuja distribuição pode ser vista na Tabela 4. Resistência às múltiplas drogas (MDR) foi considerada a resistência para duas ou mais classes de drogas, sendo encontrados 102 isolados com esse fenótipo (102/231, 44,1%). Os fenótipos MDR mais comuns foram: AMP-TET-CFZ-CFL (11 isolados), AMP-SUT-TET-CFZ-CFL (7 isolados) e AMP-SUT-TET-CFZ (5 isolados). A distribuição de resistência MDR entre as diferentes populações de gatos é mostrada na Tabela 5, com a maioria desses encontrados na população de gatos CSH (45/87; 51,7%), em seguida na população CSV (26/59; 44,0%), enquanto a população SMP contribuiu com o menor percentual de cepas MDR (31/85; 36,4%).

Tabela 4 Distribuição do perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *E. coli* isoladas de diversos sítios corporais de gatos, segundo sua população de origem, em Ituverava-SP, 2014.

Fenótipos de Resistência Antimicrobiana	Proximidade*		
	CSH (n=87)	CSV (n=59)	SMP (n=85)
AMP*	4	1	0
ATM	1	0	1
CFZ	1	2	5
CFL	0	1	0
CRO	1	1	0
NAL	0	0	1
TET	0	0	2
AMP-CFL	0	0	2
AMP-CFZ	2	0	0
AMP-SUT	0	1	0
AMP-TET	2	0	2
CFZ-CFL	0	2	3
NAL-ATM	0	1	0
NAL-NIT	3	0	0
NIT-CFL	0	1	0
NIT-CFZ	0	0	1
SUT-TET	0	1	1
AMP-CFZ-CFL	6	1	0
SUT-TET-CFZ	0	0	1
NIT-AMP-CFZ	1	0	0
NIT-CFZ-CFL	1	0	0
AMP-SUT-TET	0	9	2
AMP-TET-CFZ	2	0	1
CFZ-CFL-CPM	0	0	1
CIP-NIT-CAZ	1	0	0
TET-CFZ-ATM	0	0	1
AMP-TET-CFL	0	1	0
NIT-AMP-CFZ	1	0	0
NAL-ATM-CAZ	2	0	0
AMP-CFZ-CFL-CFO	4	1	0
AMP-TET-CFL-CFO	0	2	0
AMP-GEN-SUT-TET	0	1	0

AMP-SUT-CFZ-CFL	2	0	0
AMP-SUT-TET-CFZ	1	2	1
AMP-TET-CFZ-CFL	7	0	4
NAL-AMP-CFZ-CFL	2	0	0
NAL-AMP-SUT-TET	0	3	0
NIT-AMP-CFZ-CFL	0	0	1
NIT-TET-CFZ-CFL	0	1	0
NIT-CFZ-CFL-CRO	2	0	0
AMP-SUT-TET-CFZ-CFL	5	1	1
AMP-CFZ-CFL-CRO-CAZ	0	0	2
AMP-CFZ-CFL-CFO-CPM	0	1	0
AMP-SUT-CFZ-CFL-CFO	0	1	0
AMP-TET-CFZ-CFL-ATM	0	0	3
NAL-AMP-CFZ-CFL-CFO	1	0	0
NAL-CFZ-ATM-CFO-CAZ	0	0	1
NIT-AMP-CFZ-CFL-CRO	0	1	0
TET-CFZ-CFL-ATM-CAZ	0	0	1
AMP-SUT-TET-CFZ-CFL-CAZ	1	0	0
AMP-SUT-TET-CFZ-CFL-CRO	1	0	0
AMP-SUT-TET-CFZ-CFL-CFO	0	0	1
AMP-TET-CFZ-CFL-CFO-CPM	2	0	0
NAL-AMP-SUT-TET-CFZ-CFL	4	0	0
AMP-CFZ-CFL-ATM-CFO-CPM-CAZ	0	0	1
NAL-AMP-SUT-TET-CFZ-CFL-CFO	1	0	0
NAL-NIT-AMP-SUT-TET-CFZ-CFL-CFO	1	0	0
NIT-AMP-GEN-AMI-TET-CFZ-CFL-CRO	0	0	1
NAL-NIT-AMP-GEN-AMI-SUT-TET-CFZ-CFL-ATM	0	0	1
NAL-NIT-AMP-GEN-AMI-SUT-TET-CFZ-CFL-ATM	0	0	1
NAL-NIT-AMP-GEN-SUT-TET-CFZ-CFL-ATM-CRO-CAZ	0	0	1

*População de gatos próxima aos centros de saúde humana (CSH); próxima a centros de saúde veterinária (CSV) e sem proximidade com esses locais (SMP). * amoxicilina-ácido clavulânico (AMC), amicacina (AMI), ampicilina (AMP), aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), ciprofloxacina (CIP), cefalotina (CFL), cefoxitina (CFO), cefazolina (CFZ) cefepime (CPM), ceftriaxona (CRO), cotrimoxazol (SUT), gentamicina (GEN), ácido nalidíxico (NAL), nitrofurantoína (NIT), norfloxacina (NOR), tetraciclina (TET).

Tabela 5 - Distribuições de resistências às múltiplas drogas (MDR) entre as cepas de *E. coli* isoladas de gatos, em Ituverava-SP, 2014, segundo as populações de origem.

População de origem*	Agentes antimicrobianos				Total
	2 Classes	3 Classes	4 Classes	> 4 Classes	
CSH (n=87)	30 (34,5)	9 (10,3)	2 (2,3)	4 (4,6)	45 (51,7)
CSV (n=59)	9 (15,2)	13 (22)	4 (6,7)	0 (0,0)	26 (44,0)
SMP (n=85)	21 (24,7)	6 (7,0)	1 (1,2)	3 (3,5)	31 (36,4)

Foi realizada análise filogenética em 191, dos 231 isolados de *E. coli* deste estudo. A Figura 19 mostra a visualização, em gel de agarose, da reação de amplificação dos produtos de DNA, por Triplex PCR, de algumas cepas, para a detecção dos genes *chuA*, *yjaA* e TspE4C2.

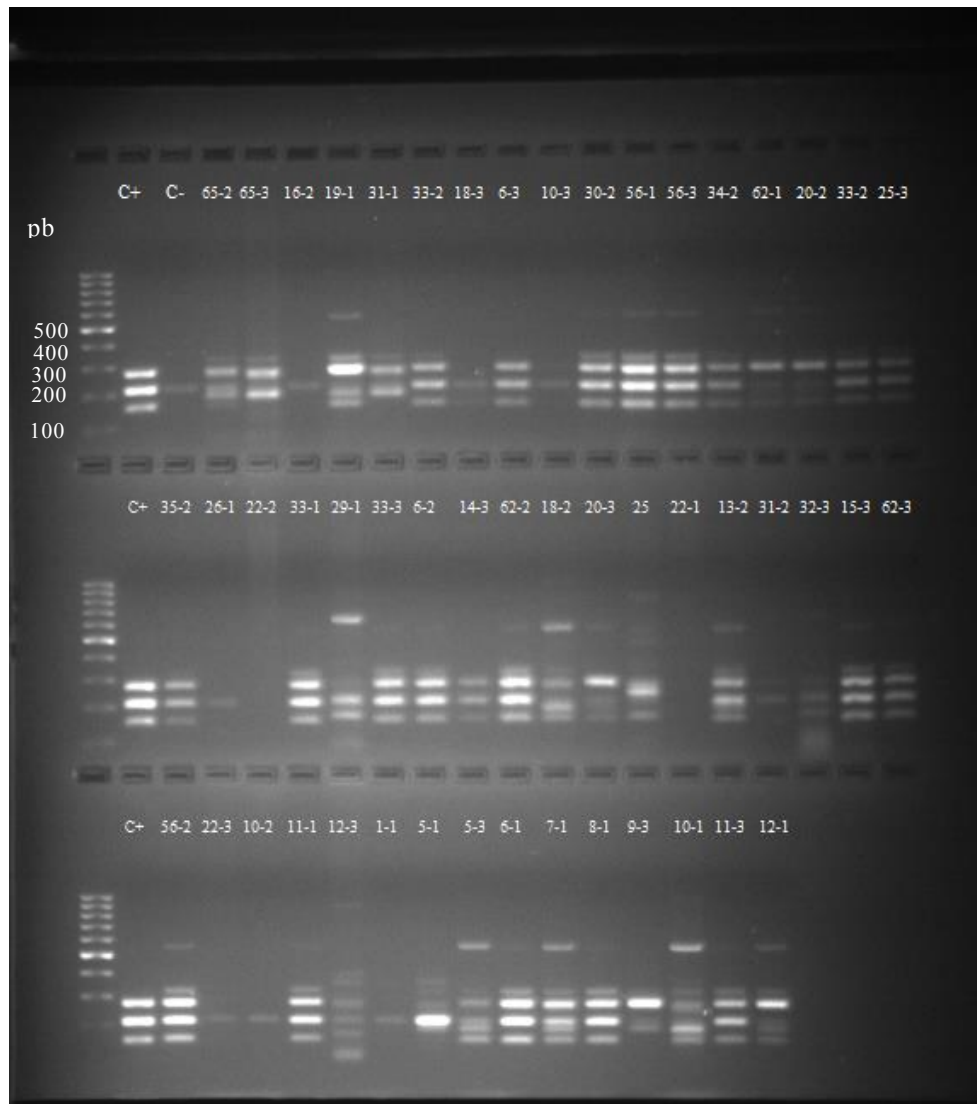


Figura 18 Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) Triplex. Canaletas 1; 21; 41: marcador de peso molecular (100 pb), canaleta 2; 22; 42: C+ = controle positivo genes *chuA* (279 pb), *yjaA* (211 pb) e TspE4C2 (152 pb), canaleta 3: C- = controle negativo, canaletas 4, 5, 7, 8, 17, 18, 32, 33, 36, 54, 57: grupo D; canaletas 9, 11, 13, 14, 14, 16, 19, 20, 23, 26, 28, 29, 30, 31, 34, 39, 40, 43, 46, 51, 52, 53, 56: grupo B2; canaleta 49: grupo B1; canaletas 6, 10, 12, 24, 25, 27, 35, 37, 38, 44, 45, 47, 48, 50, 55: grupo A.

A Tabela 6 mostra a distribuição dos filogrupos, com suas respectivas resistências, entre os isolados analisados. Também é possível observar o número de cepas por população de origem, para cada um dos grupos encontrados. A Figura 19 representa as cepas susceptíveis e resistentes dentro de cada um dos grupos filogenéticos.

Tabela 6 Distribuição dos grupos filogenéticos, mostrando os números absolutos e os percentuais de resistência de isolados de *E. coli* dentro de cada grupo e população de gatos, em Ituverava, 2014.

Grupos Filogenéticos (n cepas =191)				
	Percentual de isolados (%)			
	A (n=95; 49,7)	B ₁ (n=8; 4,2)	B ₂ (n=69; 36,1)	D (n=19; 9,9)
Susceptíveis	38 (40,0)	5 (62,5)	34 (49,3)	5 (26,3)
Resistentes	57 (60,0)	3 (37,5)	35 (50,7)	14 (73,7)
CSH	42 (44,2)	1 (12,5)	25 (36,2)	10 (53,6)
CSV	22 (23,1)	5 (62,5)	23 (33,3)	2 (10,52)
SMP	31 (32,6)	2 (25,0)	21 (30,4)	7 (36,8)

* População de gatos próxima aos centros de saúde humana (CSH); próxima a centros de saúde veterinária (CSV) e sem proximidade com esses locais (SMP).

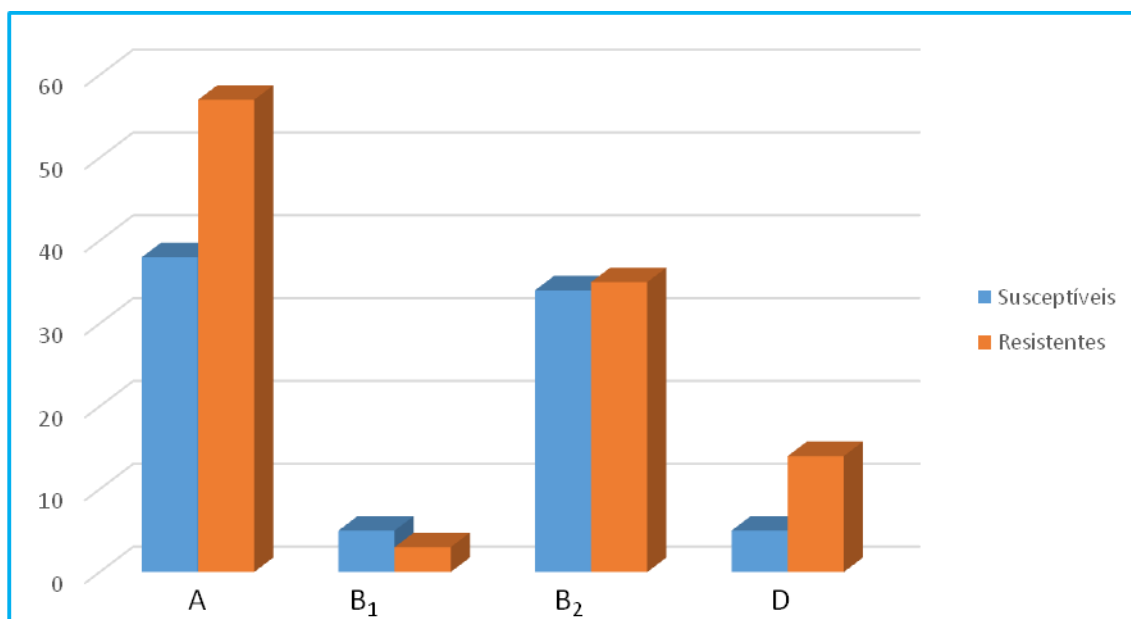


Figura 19 Representação das cepas (n=191) susceptíveis e resistentes de *E. coli* em cada um dos filogrupos (A, B₁, B₂ e D), nos gatos pesquisados em Ituverava-SP, 2014.

No grupo filogenético A foram observadas 95 cepas, sendo 42 cepas provenientes da população CSH, 22 da CSV e, 31 da SMP. A resistência antimicrobiana neste grupo filogenético foi de 60% (57/95) e mostrou pouca variação entre as diversas populações de origem, sendo encontrada em 64,3% cepas CSH (27/42), 59% cepas CSV (13/22) e, em 48,3% cepas SMP (15/31). Entretanto, pôde ser notado um menor percentual de resistência para a população SMP. Quanto à origem por sítio corporal, as cepas retais apresentaram as maiores resistências 68,5% (37/54), assim como as da genitália externa 66,7% (12/18), enquanto as oriundas do abdômen/dorso 53,8% (7/13) e as da boca 40% (4/10) apresentaram frequências um pouco menores. Dentro do grupo filogenético A houve maior semelhança entre cepas retais e da genitália externa.

O grupo filogenético B₁, observado em apenas 8 isolados de *E. coli*, apresentou a seguinte distribuição por população: uma cepa de origem CSH, 5 de CSV e 2 SMP. Destas cepas, 7 foram oriundas do reto e uma da genitália externa. A resistência antimicrobiana ocorreu em 3 cepas (37,5%), sendo todas isoladas do reto, uma em cada população de origem.

Foram observadas 69 cepas do filogrupo B₂, com as seguintes distribuições por população: 25 CSH, 23 CSV e 21 SMP. Foi observada resistência antimicrobiana em 50% das cepas. Na população CSH a resistência foi de 32% (8/25), na população CSV, de 69,5% (16/23) e na população SMP foi de 47,6% (10/21). Em relação ao sítio corporal, resistência foi notada em 51,1% das cepas B₂ provenientes do reto, 58,8% (10/17) das cepas da genitália,

50% das da boca (1/2) e, não foram isoladas cepas B₂ do abdômen/dorso, em nenhuma das populações.

O grupo filogenético D foi observado em 19 isolados (9,9%), que foram distribuídos da seguinte maneira: 10, na população CSH; 2, na CSV e, 7 na SMP. Resistência antimicrobiana ocorreu em 68,4% das cepas D (13/19), sendo que a população CSH apresentou 70% de resistência, seguida pela população CSV e SMP (50,0 e 43,0%, respectivamente). Todas as cepas do grupo D foram oriundas do reto, não sendo observadas cepas D em outros sítios corporais, entre os gatos pesquisados.

Resumidamente, as frequências de resistências, exibidas em ordem decrescente foram: D (13/19; 68,4%), A (57/95; 60%), B₂ (35/69; 50,7%) e B₁ (3/8; 37,5%).

Dentro dos grupos filogenéticos A e D, maiores prevalências de resistência foram exibidas pela população CSH, em seguida CSV e, SMP. Entretanto, para o grupo B₂, as populações CSV e SMP apresentaram maiores frequências de resistência em relação a CSH. As cepas CSH do grupo filogenético B₁ foram 100% resistentes. Enquanto as cepas desse grupo oriundas de SMP e as de CSV apresentaram menores resistências.

A distribuição da análise de grupos filogenéticos entre as 191 cepas de *E. coli* revelou que foram testadas 129 cepas provenientes do reto, 13 do abdômen/dorso, 13 da boca e 36 da vagina/prepúcio. Entre os isolados do reto, foram observados os quatro grupos filogenéticos pesquisados, sendo o grupo A mais prevalente seguidos pelos grupos B₂ e D. O grupo B₁ ocorreu em menor número: 6 (4,7%). As cepas oriundas do abdômen/dorso foram exclusivamente do grupo A. Enquanto, as provenientes da boca se distribuíram somente entre os grupos A e B₂. Cepas do grupo D não ocorreram entre os isolados da vagina/prepúcio, que exibiram maiores prevalências para o grupo B₂, seguido pelo grupo A, e o grupo B₁ apresentou uma baixa prevalência. Com relação à resistência, pôde-se observar que as cepas do grupo A oriundas do reto, apresentaram maior prevalência. A Tabela 7 demonstra, além da distribuição dos grupos filogenéticos entre os diversos sítios corporais, as frequências de resistência de cada grupo, por sítio corporal. Assim, as cepas do grupo A oriundas do reto, apresentaram a maior frequência de resistência antimicrobiana. Para o grupo A as frequências de resistência da boca e vagina/prepúcio foram iguais, enquanto para o grupo B₂ foi observada maior similaridade de prevalência de resistência entre as cepas do reto e da vagina/prepúcio.

Tabela 7 – Distribuição dos grupos filogenéticos (A, B₁, B₂ e D) das cepas de *E. coli* em relação aos diversos sítios corporais e frequências de resistência de cada grupo em cada sítio corporal de gatos, em Ituverava-SP, 2014.

Grupo Filogenético (n=191)	Sítio corporal			
	Número de Isolados			
	Isolados resistentes (%)			
	Reto (n=129)	Abdômen/Dorso (n = 13)	Boca (n = 13)	Vagina/Prepúcio (n= 36)
A (n=95)	54 (37/54; 68,5)	13 (7/13; 58)	10 (4/10; 40)	18 (12/18; 66,7)
B ₁ (n=8)	7 (3/7; 37,5)	0 (0/0; 0)	0 (0/0; 0)	1 (1/0; 0)
B ₂ (n=69)	49 (25/49; 51,1)	0 (0/0; 0)	3 (1/3; 33,3)	17 (10/17; 58,8)
D (n=19)	19 (14/19; 73,7)	0 (0/0; 0)	0 (0/0; 0)	0 (0/0; 0)

O consumo de antibióticos pelas unidades de Saúde Pública Humana, em Ituverava-SP, durante um período de 12 meses (2014), está demonstrado na Figura 20, onde se observa que os antimicrobianos betalactâmicos (amoxicilina-clavulanato de potássio, amoxicilina, ampicilina-sulbactam, ampicilina, cefaclor, cefalexinas, cefalotina, cefazolina e ceftriaxona dissódica) apresentaram um alto padrão de consumo, em relação às demais classes de antimicrobianos.

A Tabela 8 discrimina os agentes antimicrobianos e respectivas quantidades (em mg) usados na Saúde Pública Humana de Ituverava (um hospital público e seis postos de saúde da família), no ano de 2014.

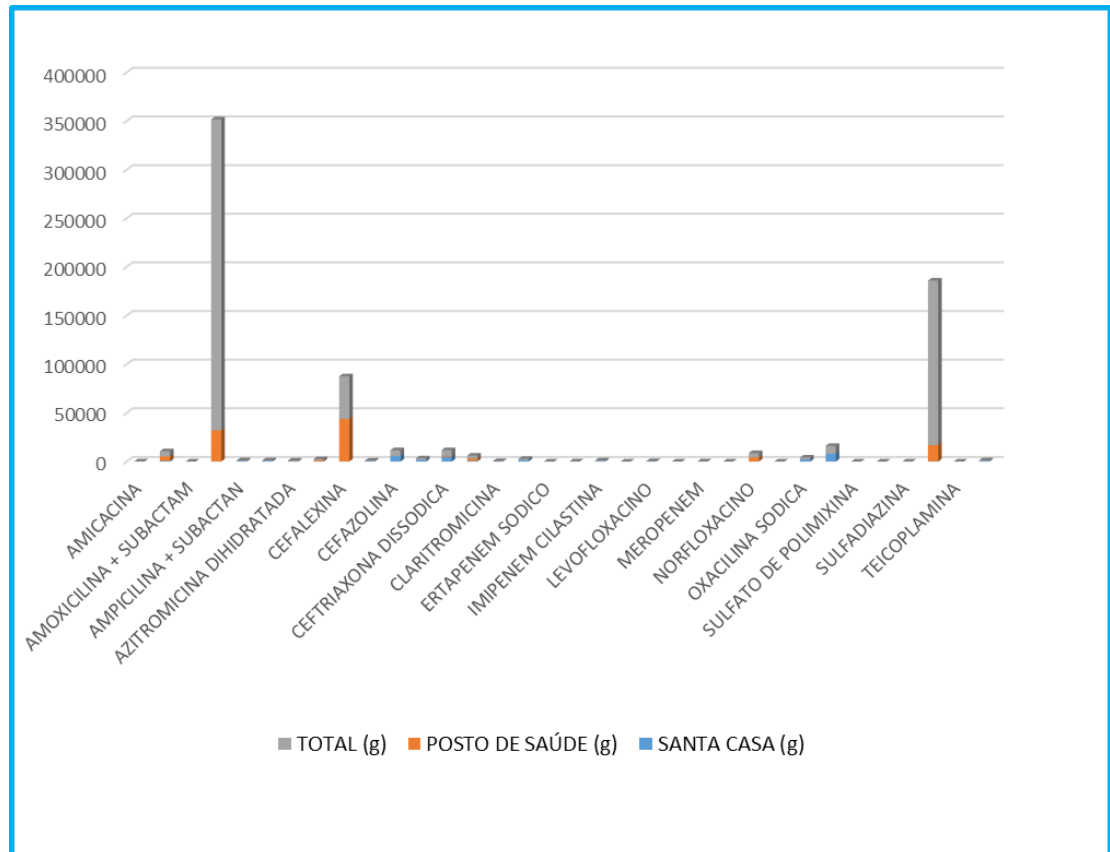


Figura 20 Representa os agentes antimicrobianos consumidos nos Postos de Saúde e Hospital Público (Santa Casa de Misericórdia de Ituverava) em um período de 12 meses (2014).

Tabela 8 Consumo de agentes antimicrobianos (mg) em um período de 12 meses (2014) nas unidades de Saúde Pública Humana, em Ituverava-SP.

ANTIMICROBIANO	SANTA CASA (mg)	POSTOS DE SAÚDE (mg)	TOTAL (mg)
AMICACINA	101500	0	101500
AMOXICILINA + CLAVULANATO DE POTÁSSIO	650500	4632152	5282652
AMOXICILINA + SUBACTAM	0	0	0
AMOXICILINA	74000	319652500	319726500
AMPICILINA + SUBACTAN	630000	0	630000
AMPICILINA	624000	0	624000
AZITROMICINA DIHIDRATADA	28900	349500	378400
CEFACLOR	26000	1056000	1082000
CEFALEXINA	131500	43641000	43772500
CEFALOTINA	486000	0	486000
CEFAZOLINA	5810000	0	5810000
CEFEPIMA	1642000	0	1642000
CEFTRIAXONA DISSODICA	5012000	827500	5839500
CIPROFLOXACINO	686000	2347560	3033560
CLARITROMICINA	157500	42000	199500
CLINDAMICINA	1354800	0	1354800
ERTAPENEM SODICO	27000	0	27000
GENTAMICINA	49540	0	49540
IMIPENEM CILASTINA	542500	0	542500
ITRACONAZOL	1700	0	1700
LEVOFLOXACINO	184500	0	184500
LINEZOLIDA	6600	0	6600
MEROPENEM	74000	0	74000
NITROFURANTOINA	6500	0	6500
NORFLOXACINO	22400	4317600	4340000
OFLOXACINO	4,5	906	910,5
OXACILINA SODICA	2039500	0	2039500
PENICILINA BENZATINA	1377800000	1112000000	2,49E+09
PIPERACILINA SODICA + TAZOBACTAN	8041500	0	8041500
SULFATO DE POLIMIXINA	19000	0	19000
RIFAMICINA	60	0	60
SULFADIAZINA	5000	0	5000
SULFAMETAZOL + TRIMETROPINA	231760	16684800	16916560
TEICOPLAMINA	2000	0	2000
VANCOMICINA	669500	0	669500

6. DISCUSSÃO

A crescente percepção de animais de estimação como verdadeiros membros da família veio acompanhada de importantes mudanças nas sociedades humanas. Nas décadas recentes, escassez de tempo e espaço levaram ao aumento da popularidade dos gatos como animais de companhia, uma vez que estes se enquadram melhor à nova realidade urbana. No Brasil, embora a população de cães ainda seja maior, a população de gatos tem apresentado crescimento anual maior. (LANCENDORFER et al., 2008; BRANDES, 2009; ABINPET, 2013).

Atualmente, observa-se um aumento no uso de agentes antimicrobianos, tanto na saúde humana como animal (BALL et al., 2008; BLACK et al., 2009), o que pode provocar alterações, não apenas nas microbiotas das espécies alvos, mas também na ecologia microbiana ambiental. Dessa forma, o conhecimento do papel epidemiológico dos gatos na disseminação de micro-organismos resistentes de suas microbiotas é importante, pois exibem características comportamentais que incluem constantes interações com o ambiente externo de suas residências. Isto é particularmente preocupante ao se considerar a estreita convivência com os humanos, observada atualmente (GUARDABASSI et al., 2004; KRAUSE, 2005; DANTAS, 2010).

No presente trabalho, a possibilidade de interação dos gatos pesquisados com os arredores de suas residências foi verificada. Embora, todos os gatos pesquisados ($n= 65$) fossem domiciliados, muitos deles foram classificados como semi-restritos, por manterem o hábito característico da espécie de perambular pelas redondezas. Entre a população estudada, 30 gatos (46,1%) apresentavam acesso irrestrito à rua, enquanto 20 (30,8%), acesso esporádico (acesso com frequência menor que uma vez ao dia, e por curtos períodos) e, apenas 15 desses animais (23%) eram restritos à residência. Lages (2009) relatou livre acesso à rua, em 55% dos gatos pesquisados, em Jaboticabal. Esses dados são coerentes com vários estudos etológicos sobre os gatos que revelam o comportamento característico da espécie de, embora domiciliados, terem acesso à rua. Além disso, exibem hábito predatório oportunista, o que significa que mesmo quando alimentados por seus tutores, praticam a caça (BUFFINGTON et al., 2006; DANTAS, 2010). Estudos verificaram a atividade de caça praticada, com grande frequência, por gatos domésticos imediatamente após terem ingerido uma refeição completa, incluindo carne. Esse comportamento implica em riscos à saúde pública, pois em suas atividades naturais de caça, os gatos geralmente têm acesso ao lixo e outros resíduos de atividade humana, podendo veicular zoonoses (TENNENT e DOWNS,

2008; GERHOLD e JESSUP, 2013). A alta sensibilidade em relação ao ambiente é reconhecida como um dos principais motivos que levam os gatos à necessidade de explorar os ambientes ao redor de suas residências (CANNON, 1929 apud BUFFINGTON et al., 2006). Pois, o ambiente interno das residências pode ser desinteressante e monótono para esta espécie, o que pode resultar em estresse e várias doenças, além de distúrbios de comportamento (CARLSTEAD et al., 1992; CARLSTEAD et al., 1993; WINDMAN et al., 1992; KOOLHAS et al., 1999; CARLSTEAD e SHEPHERDSON, 2000; BUFFINGTON, 2002).

Os resultados do presente estudo quanto à convivência dos gatos com outros gatos e/ou espécies refletem a percepção dos tutores das características gregárias desses animais, pois, entre os animais pesquisados, a maioria (41 gatos; 63%) coabitava com outros gatos e espécies, sendo a espécie mais prevalente o cão e, somente quatro animais eram os únicos pets da residência. Esses resultados estão de acordo com estudos sobre as características de posse de gatos, pois, em geral, os tutores desses animais abrigam mais de um gato em sua residência (CARLSTEAD et al., 1993; CENTOZE; LEVY, 2002; CROWELL-DAVIS et al., 2004; DIAS et al., 2004). Além disso, estudos mostram que grande parte dos tutores de gatos tem o hábito de alimentar gatos de rua, ou gatos ferais (LEVY; CRAWFORD, 2004). Esses formam colônias compostas por cerca de 4 a 12 gatos que se estabelecem ao redor da residência de quem os alimenta (CENTOZE; LEVY, 2002). A convivência de vários animais no mesmo ambiente favorece o compartilhamento de micro-organismos de suas microbiotas e a transferência horizontal de genes entre esses. (GUARDABASSI et al., 2004; BRYAN et al., 2004; JOHNSON et al., 2008, 2009). Assim, o acesso à rua, por grande parte dos gatos nesse estudo, implica na possibilidade de trazerem micro-organismos dos ambientes onde exploram e compartilhá-los, além de seus tutores, com os outros animais da residência, mesmo que esses não tenham livre acesso à rua. (GERHOLD; JESSUP, 2012).

Em contraste com a atual percepção da sociedade sobre a grande importância da relação entre humanos e animais de estimação, verificada pelo constante aumento do número desses animais nos lares, pelo alto desenvolvimento de todos os setores relacionados ao comércio de produtos e serviços destinados a atender às necessidades dos pets, verifica-se ainda um alto contingente de animais abandonados nas ruas. Desta forma, pode-se afirmar que a intensa convivência entre humanos e animais de estimação nem sempre tem sido acompanhada por atitudes de posse responsável, expondo, tanto animais como humanos, a vários riscos, entre estes, a transmissão de doenças. (LAGES, 2009). Embora a possibilidade de acesso à rua, exibida por gatos mantidos por tutores em residências, reflita um

comportamento característico da espécie, existem alternativas que permitem restringir o animal ao domicílio sem maiores problemas ou consequências como estresse. A adoção de atitudes que permitem o enriquecimento ambiental, através da introdução de novidades, como caixas e outras adequações que tornam o local mais estimulante e atrativo, minimizam o estresse de gatos mantidos restritos nos interiores das residências e, ao mesmo tempo, evitam os riscos de disseminação de zoonoses e outras doenças. (CARLSTEAD et al., 1993; KOOLHAS et al., 1999; BUFFINGTON et al., 2006).

A alta interação de gatos não restritos com ambientes variados implica também na possibilidade de disseminação de micro-organismos resistentes a antimicrobianos, particularmente no caso destes animais viverem próximos às áreas onde esses micro-organismos tendem a ser mais abundantes, como arredores de locais onde se presta assistência à saúde humana ou animal. Krumperman (1983) relaciona as maiores frequências de isolamento de bactérias resistentes às múltiplas drogas aos ambientes onde existe exposição aos agentes antimicrobianos, reconhecendo frequências, em geral, superiores a 20% nestes ambientes, em contraste com frequências menores que estas nos ambientes onde antimicrobianos são raramente usados. Ampla distribuição de cepas *E. coli ESBL positivas* e, portanto, mais relacionadas à resistência às múltiplas drogas, têm sido relatadas entre hospitais e ambientes próximos a estes. (KORZENIEWSKA et al., 2013).

Animais de estimação têm sido estudados como uma fonte de micro-organismos resistentes a antimicrobianos. Em geral, com o foco das pesquisas em animais onde infecção ou traumatismo está presente. Poucos estudos examinaram animais saudáveis como prováveis portadores de bactérias resistentes (PAULA; MARIN, 2008; MURPHY et al., 2009; DAVIS et al., 2011; LEITE-MARTINS et al., 2014), somente Davis et al. (2011) relataram a distribuição destes organismos em diferentes partes do corpo do animal que rotineiramente entram em contato com humanos. E nenhum desses trabalhos verificou diferenças em isolados de animais de companhia em relação à proximidade de seu hospedeiro com locais de assistência à saúde humana ou veterinária, onde o uso de agentes antimicrobianos é rotineiro.

Embora *E. coli* seja prevalente na microbiota intestinal, também foi possível isolar cepas dessa bactéria nos outros sítios corporais pesquisados, como pele, boca e genitália externa, o que está de acordo com o reportado por Davis et al. (2011), que conseguiram isolamento de *E. coli* de boca, nariz, abdômen, virilha e reto de gatos saudáveis em Atenas, E.U.A. A presença de isolados de *E. coli* na pele de gatos, verificada através de amostras coletadas do abdômen ou dorso (17/231; 7,3%) pode estar relacionada ao hábito do gato se lambar, e através disso veicular bactérias do reto para outras superfícies corporais, ou à

contaminação ambiental. Segundo Kahn e Line (2010), *E. coli* e outros micro-organismos estão presentes na pele como microbiota transitória e, em alguns casos, podem atuar também como patógenos oportunistas. A constituição da microbiota da pele varia em função do clima, idade do animal e hábitos de higiene, sendo que a maioria dos micro-organismos em contato direto com a superfície corporal dos gatos não se torna residente em virtude das secreções sebáceas e sudoríparas apresentarem propriedades antimicrobianas. Além disso, o pH da pele a torna inóspita para grande parte de micro-organismos. (FITZGERALD, 2009). Durante o hábito natural de higienização dos gatos através do ato de se lambem, micro-organismos da microbiota de seus diversos sítios corporais são postos em contato. Desta forma, bactérias presentes no reto são transferidas para áreas como boca e nariz e, destas para várias outras superfícies corporais, como abdômen, dorso e virilhas, por exemplo. Uma das implicações deste comportamento é a presença, em geral transitória, de micro-organismos do trato intestinal, como *E. coli*, em outros locais do corpo além do intestino grosso (DAVIS et al., 2011).

A frequência de isolamento de *E. coli* da boca dos gatos nesse estudo foi semelhante à da pele (18/231; 7,8%). Essa bactéria pode fazer parte da microbiota residente ou transitória da boca de gatos e, sua permanência nesse sítio corporal está relacionada a hábitos de higiene, tipo de alimentação, comportamento e interação social, sendo mais abundantemente encontrada na microbiota oral de animais que vivem em colônias, isto é, animais que apresentam muitas interações com outros de sua espécie. Cepas de *E. coli* isoladas da boca de cadelas com piometra e de seu conteúdo uterino, portadoras de genes de virulência característicos de cepas uropatogênicas têm sido relatadas. Essas cepas apresentaram grande similaridade genética entre elas, o que alerta para a possibilidade da boca disseminar cepas virulentas. Refletem, ainda, a possibilidade de veiculação de cepas de *E. coli* do reto para a boca e genitália através do hábito do animal de lambem a região da vagina e do reto. (AGOSTINHO et al., 2013).

O isolamento de *E. coli* na genitália externa (vagina ou prepúcio) foi o de segunda maior prevalência nesse trabalho, tendo sido isolado tanto da vagina como do prepúcio dos gatos saudáveis, ocorrendo em 37 amostras (16%). Isto está de acordo com vários estudos que relatam isolamento abundante de bastonetes gram-negativos provenientes do trato gastrointestinal, especialmente *E. coli*, na mucosa vaginal de gatas (CAMPERO et al., 1992; SCHOCKEN-ITURRINO et al., 1992b; KUNZ et al., 2002). Quanto ao prepúcio, entretanto, são poucos os trabalhos sobre a composição de sua microbiota em gatos domésticos. Porém, para gatos selvagens, *E. coli*, além de outros micro-organismos, são relatados (GUIDO et al.,

2000). O isolamento nesse sítio corporal pode ser explicado pela transmissão de cepas do reto, por lambedura ou pelo decúbito ventral, quando cepas de *E. coli* do ambiente podem colonizar transitoriamente a mucosa do prepúcio ou até se estabelecer como microbiota residente. (JOHNSON, 2006; NASCIMENTO et al., 2011).

As cepas de origem retal compuseram a maioria dos isolados (159/231; 68,8%) desse trabalho. Davis et al. (2011) encontraram frequência menor (165/317; 52%) investigando cães e gatos, ainda assim, as cepas retais foram a maioria. Tal fato deve-se a alta prevalência de *E. coli* no trato intestinal de gatos, particularmente, no intestino grosso, sendo esta espécie uma das que albergam o maior número de unidades formadoras de colônias, por gramas de fezes, desse micro-organismo, podendo chegar a 10^{14} UFC. (GLYLES; FAIRBROTHER, 2004; LEY et al., 2008).

A delimitação da área percorrida pelos gatos ao explorar os arredores de sua residência, chamada área de vida, reflete o comportamento territorialista desses animais e, é estimada em 2,1 a 4,24 ha para os gatos machos e 0,5 a 1,19 ha para as fêmeas. Embora, no presente trabalho, a área percorrida pelos gatos durante seu acesso à rua não foi mensurada, a medida da área de vida obtida por outros autores que estudaram o comportamento de gatos domésticos e ferais (BARRATT, 1997; EDWARDS et al., 2001; FERREIRA, 2011) foi utilizada para caracterizar as populações de gatos estudadas com relação à proximidade de locais onde o uso de antibióticos é rotineiro, com a finalidade de verificar a influência dessa proximidade no isolamento de cepas de *E. coli* resistente a antimicrobianos.

Assim, entre os isolados de *E. coli* do presente estudo, a distribuição das 89 cepas susceptíveis (89/231; 38,5%) aos 17 antimicrobianos testados revelou que as populações de gatos próximas aos centros de saúde humana (CSH) ou veterinária (CSV) mostraram susceptibilidades menores (32/87; 36,8% e 22/59; 37,3%, respectivamente) quando comparadas à população SMP (35/85; 41,1%). Menores taxas de susceptibilidades entre os isolados de *E. coli* provenientes dos gatos das populações CSH e CSV podem ser explicadas pela disseminação de cepas resistentes a partir das unidades de saúde, em consequência de contaminação ambiental. Cepas de *E. coli* e outras *Enterobacteriaceas* resistentes a antimicrobianos têm sido relatadas por vários autores em áreas próximas às unidades de assistência à saúde, indicando contaminação ambiental (PRADO et al., 2008; YANG et al., 2009; MANSSOURI; ABASSI, 2010; CHANGE et al., 2010; CHAGAS et al., 2011). Também deve ser considerada a possibilidade de maior exposição da microbiota dos gatos dessas populações aos agentes ou resíduos de antimicrobianos presentes nesses ambientes. Entretanto, deve-se considerar que a concentração de resíduos de antimicrobianos, geralmente

é muito baixa nos ecossistemas, em geral, da ordem de ng/L a µg/L, na água e, µg/Kg a mg/Kg no solo (LEUNG et al., 2012), porém cepas resistentes a antimicrobianos podem ser facilmente disseminadas a partir das unidades de saúde, principalmente através do esgoto e dos resíduos sólidos (lixo hospitalar). Atualmente, cepas com fenótipos de resistência típicos de isolados hospitalares têm sido encontradas em isolados clínicos da comunidade, inclusive em comensais da microbiota de humanos e animais saudáveis (CARATTOLI et al., 2005; COSTA et al., 2008; MURPHY et al., 2009). Entretanto, o papel das instituições de saúde na disseminação de cepas resistentes para o ambiente ainda é muito pouco esclarecido.

Ainda, a maior frequência de isolados susceptíveis a todos os antimicrobianos testados foi observada para as cepas provenientes do reto (54/89; 60,6%), em todas as populações do presente trabalho, sendo que a população SMP contribuiu com a maioria delas. Em geral, isolados de *E. coli* resistente a antimicrobianos em animais de companhia têm sido obtidos das fezes ou reto (AUTHIER et al., 2006; PAULA; MARIN, 2008; COSTA et al., 2008). Entretanto, a convivência típica com animais de companhia, especialmente gatos, envolve contato com outros sítios corporais do animal. Neste estudo, *E. coli* resistente a antimicrobianos, observada em outros sítios corporais de gatos saudáveis, como boca, abdômen, dorso e genitália externa, além do reto, é uma razão de preocupação, porque o estreito contato entre pets e humanos oferece condições favoráveis para a transmissão de bactéria por contato direto (carícias, lambidas, contato com feridas, etc) ou através do ambiente doméstico (contaminação de roupas, mobília, etc). Martins et al. (2013) encontraram cepas de *E. coli* com semelhantes fenótipos de resistência às múltiplas drogas em animais de estimação, humanos e diversas superfícies da residência, como chão, porta da geladeira e comedouro do animal, entre outros. Isto indica que o contato estreito entre humanos e pets e, em seguida, o contato com as superfícies das residências permite a contaminação do ambiente doméstico. Desta forma, móveis, chão, maçanetas, enfim, superfícies no interior da casa podem contribuir para a difusão de cepas de *E. coli* resistentes entre humanos e animais que coabitam.

Crianças estão sob risco maior que adultos devido ao contato físico mais próximo com os gatos, assim como, com o ambiente contaminado por pets (assoalho, carpetes, etc) (VAN DEN BOGAARD; STOBBERING, 2000; GARDABASSI et al., 2004; LEITE-MARTINS et al., 2014).

No presente trabalho, a resistência, a no mínimo um agente antimicrobiano, foi exibida por grande parte dos isolados (64,1%). Leite-Martins et al. (2014) também encontraram altas prevalências de resistência antimicrobiana em cepas de *E. coli* isoladas de gatos, em Portugal.

Em geral, as frequências de resistência para a maioria dos antibióticos testados nos dois estudos foram próximas, porém, para ciprofloxacina e ácido nalidíxico foram encontradas prevalências muito menores neste estudo. Os autores de Portugal encontraram correlação entre os altos níveis de resistência às quinolonas (ciprofloxacina e ácido nalidíxico), o histórico de tratamentos prévios com esses antimicrobianos, e o hábito de coprofagia exibidos pelos gatos pesquisados. No presente trabalho, as frequências menores obtidas para esses mesmos antimicrobianos podem ser explicadas pela não utilização de animais tratados com antibióticos há menos de 6 meses da data da coleta.

Entre as cepas de *E. coli* do presente trabalho, não ocorreram resistência aos agentes antimicrobianos amoxicilina-ácido clavulânico e norfloxacina. Em estudos também conduzidos com gatos, nos Estados Unidos, susceptibilidades completas foram exibidas para os antimicrobianos ceftriaxona, ciprofloxacina, trimetopim-sulfametoxazol (DAVIS et al., 2011) e, em Portugal para os antimicrobianos cefoxetina e cefotaxima não foram relatadas cepas resistentes (LEITE-MARTINS et al., 2014).

No presente estudo, as prevalências para os antimicrobianos beta lactâmicos: ampicilina, cefazolina e cefalotina foram maiores do que as encontradas por Davis et al. (2011) nos EUA. De um modo geral, as pesquisas conduzidas com gatos no Canadá (AUTHIER et al., 2006; MURPHY et al., 2009) e Estados Unidos (DAVIS et al., 2011) encontraram menores frequências de resistência para a maioria dos antimicrobianos testados em relação ao presente estudo. Essas variações observadas mostram que os padrões de resistência variam entre diferentes regiões geográficas, principalmente em função do uso preferencial de agentes antimicrobianos. Em uma ampla revisão sobre resistência, Theuretzbacher (2013), chama a atenção para as diferenças nos padrões de resistência e destaca alguns países da Ásia, do Mediterrâneo, da América Central e parte da América do Sul como portadores de um alto nível endêmico de resistência, citando regiões onde os níveis de *E. coli* com fenótipo *ESBL* podem variar entre 10 a 30%, enquanto em outros, ocorre em taxas superiores a 30%.

No presente trabalho, foram encontrados dois fenótipos de *E. coli ESBL*. Embora essa frequência seja baixa, deve-se alertar para a sua relevância, pois tais cepas: exibem resistência à praticamente todos os beta lactâmicos, incluindo cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações e aztreonam, importantes antimicrobianos utilizados em infecções mais graves; carregam genes de resistência às quinolonas, aminoglicosídeos e tetraciclinas no mesmo cassete gênico, sendo portanto multirresistentes (OLIVEIRA et al., 2009; LOPES, 2010) e exigem protocolos para sua detecção que nem sempre são utilizados na rotina clínica laboratorial, ficando sua

ocorrência subestimada. Fenótipos de multirresistência entre cepas *ESBL* positivas podem alcançar taxas superiores a 80%. (SIMNER et al., 2011).

A origem de uma, das duas cepas *E. coli ESBL* positiva, foi a população SMP. Porém, foi verificado que o gato portador dessa cepa fora trazido de London, Canadá, sete meses antes da data da coleta. A residência de seu proprietário ficava a aproximadamente 200m do Victoria Hospital, importante centro de saúde humana. Também foi apurado que, embora restrito ao apartamento do proprietário, o gato coabitava com um cão que era levado em passeios diários em frente ao hospital. No Canadá, Murphy et al. (2009) também encontraram *E. coli ESBL* positivas em animais de companhia, porém em frequência menor que a do presente estudo, enquanto, na Itália, Carattoli et al. (2005) encontraram frequências maiores (4,9%) que a dos estudos anteriormente citados para esse fenótipo. A possibilidade de transmissão de *E. coli ESBL* positiva de resíduos hospitalares e municipais para a comunidade tem sido pesquisada, com o foco da atenção em esgotos hospitalares (PRADO et al., 2008; CHAGAS et al., 2011), nos tratamentos das águas residuárias de efluentes hospitalares (STORTEBOOM et al., 2010; HUANG et al., 2012; KORZENIEWSKA et al., 2013), e nos resíduos sólidos ou lixo hospitalar (MBONGWE et al., 2008; KOOLIVAND et al., 2012; TETLEH-QUARCOO et al., 2013). No Brasil, cepas *ESBL* de origem hospitalar também têm sido relatadas com frequência. Entretanto, o surgimento de cepas de *E. coli ESBL* de origem ambiental, comunitária, em alimentos de origem animal (SILVA et al., 2010) e em animais de estimação, principalmente cães e gatos (CARATTOLI et al., 2005; MURPHY et al., 2009) têm demonstrado a complexidade em se estabelecer a origem desta resistência. (SILVA; LINCOPAN, 2012).

Um grande número de diferentes padrões de fenótipos foi encontrado no presente estudo, o que está de acordo com outros relatos. (DAVIS et al., 2011; LEONARD et al., 2012). Entre os 61 padrões de fenótipos exibidos pelas cepas de *E. coli*, alguns como: AMP-TET-CFZ-CFL; AMP-SUT-TET-CFZ-CFL e AMP-SUT-TET-CFZ apresentaram maiores prevalências. Chama a atenção, o elevado número de diferentes fenótipos, contendo antimicrobianos betalactâmicos, em diferentes combinações entre eles e com outras classes de drogas. Em estudo conduzido com gatos e cães, nos EUA, Davis et al. (2011) encontraram 21 padrões de fenótipos, sendo 18 destes resistentes às múltiplas classes de drogas (MDR), número considerado elevado, porém menor que o do presente estudo. Assim, como os autores anteriormente citados, na presente pesquisa, resistência MDR foi considerada a resistência para duas ou mais classes de drogas, sendo encontrados 102 isolados com esse fenótipo (44,1%), o que representa um elevado percentual. A população CSH contribuiu com a maioria

das cepas MDR (51,7%), enquanto a população SMP contribuiu com 36,4%. Resistência a antimicrobianos caracteristicamente usados em unidades de assistência à saúde humana, como cefazolina e cefalotina chamam à atenção quanto à sua ocorrência na população CSH. O antimicrobiano cefepime, de uso restrito hospitalar e de última escolha para infecções mais graves também foi relacionado a essa população.

Resíduos produzidos em instituições de saúde têm causado sérias preocupações devido ao tratamento e disposição final inadequados que podem resultar em impactos negativos para a saúde pública e para o ambiente (DIAZ et al., 2005; KORZENIEWSKA et al., 2013). O problema de contaminação ambiental com resíduos hospitalares é maior nos países em desenvolvimento, pois muitas vezes, esse lixo é descartado com o doméstico sem receber qualquer tratamento prévio, o que implica em grande risco para os trabalhadores municipais da coleta de lixo, o público e o ambiente (ZARCHI; VATANI, 2009; DAMANI et al., 2013). No Brasil, a Associação Brasileira de Engenharia Ambiental e Sanitária (ABES, 2000) estima que 70% das cidades brasileiras descarte o lixo doméstico e os resíduos médicos juntos, em lixões municipais, o que pode acarretar sérios problemas de saúde pública.

Gatos, geralmente, podem vagar livremente do lado de fora e são capazes de procurar restos alimentares ou caçar pequenas presas no lixo (FITZGERALD; TURNER, 2000; FERREIRA, 2011), tornando-se, desta forma um potencial carreador, em seu intestino, ou outro local de seu corpo, de *E. coli* proveniente do lixo (TENNENT e DOWNS, 2008).

Pela estatística multivariada pôde-se confirmar que isolados de *E. coli* provenientes da população CSH exibiram frequências mais altas para ampicilina, cefazolina, cefalotina, tetraciclina. Enquanto, em cepas provenientes de população CSV, a resistência ao cotrimoxazol foi mais frequente. Isto está de acordo com os registros de consumo de antibióticos nas instituições de saúde envolvendo as áreas geográficas pesquisadas, que demonstram o uso maciço de antibióticos beta lactâmicos em hospitais e postos de saúde municipais entre pacientes humanos, enquanto na medicina veterinária o uso de cotrimoxazol é muito frequente.

Transferência horizontal de resistência ou de bactérias pode ocorrer na direção oposta, do humano para o pet. Melo (2014) encontrou elevado percentual de *E. coli ESBL* positiva na microbiota comensal de animais de companhia, em estudo inédito conduzido no Brasil, alertando para a existência de portadores assintomáticos desse importante fenótipo de resistência, assim como elevado percentual de resistência a betalactâmicos não *ESBL*. Busch et al. (2007) isolaram cepas *STEC* em gato assintomático e, em uma criança de três anos, acometida por diarreia que convivia com esse gato. Estes estudos chamam a atenção, também,

para a possibilidade da colonização de animais de companhia por cepas de origem humana. Um evento específico que ilustra esta possibilidade parece ter sido encontrado no presente estudo envolvendo um gato restrito à casa e pertencente à população SMP que apresentou cinco isolados de *E. coli* resistentes a antibióticos como cefazolina e cefalotina, mais relacionados à saúde humana e, aztreonam, monobactâmico de uso restrito hospitalar, para situações de mais gravidade. Foi posteriormente apurado que o proprietário é médico e trabalha na unidade de tratamento intensivo do principal hospital da cidade.

As cepas de *E. coli* apresentam origem filogenética diversa, dividida em quatro grupos principais (A, B₁, B₂ e D), nos quais a maioria dos isolados são encontrados. Entretanto, estudos recentes permitem caracterizar oito grupos filogenéticos (A, B₁, B₂ e C, D, E, F). (CLERMONT et al., 2000; CLERMONT et al., 2013). No presente trabalho, a análise filogenética realizada nas cepas de *E. coli*, permitiu encontrar os quatro principais filogrupos: A, B₁, B₂ e D. Geralmente, os clones virulentos extra intestinais de *E. coli* (ExPEC) encontram-se no grupo B₂, em sua maioria, e menos frequentemente no grupo D, enquanto suas cepas comensais pertencem, geralmente, aos grupos A e B₁. (PICARD et al., 1999; JOHNSON; STELL, 2000; CLERMONT et al., 2000). Dessa forma, apesar de todas as cepas de *E. coli* do presente estudo serem obtidas de diversos sítios corporais de gatos saudáveis, algumas cepas foram classificadas em filogrupos característicos por albergarem cepas virulentas, como B₂ e D. Entretanto, a maioria das cepas isoladas pertenciam ao grupo filogenético A (95/191cepas; 49,73%), em todas as populações pesquisadas. Davis et al. (2011) encontraram alta prevalência de isolados de *E. coli* do grupo filogenético B₂ (70%) em todos os sítios corporais de gatos saudáveis e não encontraram cepas do grupo A. A classificação filogenética de *E. coli* isolada da urina de cães e gatos com infecção do trato urinário realizada por Ozugui (2008) verificou alta prevalência do grupo filogenético B₂. Entre os isolados provenientes dos gatos, a autora citada encontrou somente cepas dos filogrupos B₂ (a maioria) e D, enquanto as provenientes dos cães exibiram os quatro principais filogrupos (também com predominância do grupo B₂). Também foram realizadas sorotipagem e verificação de genes de virulência que permitiram classificar esses isolados como ExPEC. Deve-se ainda ressaltar, que foi verificada grande similaridade destas cepas com as isoladas de humanos, o que destaca o seu potencial zoonótico.

Vários estudos mostram que em populações humanas nota-se a prevalência do filogrupo A, com variações entre regiões geográficas, mas de uma forma geral, ocorrem em cerca de 40% da população, as cepas B₂ compõem aproximadamente 25%, da população, enquanto cepas B₁ e D são menos comuns (17%). Cepas de origem animal são

predominantemente do grupo B₁ (41%), seguida por A (22%), B₂ (21%) e D (16%). (NOWROUZIAN et al., 2009; TENAILLON et al., 2010; ALM et al., 2011). Entretanto, essa variação de prevalência entre os grupos filogenéticos não é devida a existência de cepas específicas por hospedeiro. De fato, poucas cepas apresentam especificidade de hospedeiro, como algumas cepas B₁ produtoras de hemolisinas que têm sido exclusivamente identificadas em animais, enquanto clones avirulentos de B₂ do tipo O81 têm sido apenas isoladas de humanos. Além desses fatos recentemente conhecidos, os filogrupos não apresentam uma clara associação com espécies de hospedeiros, embora tenham prevalências variáveis. Apenas recentemente, estudos têm contribuído para entender os fatores envolvidos na distribuição dos filogrupos entre hospedeiros e ambientes. Entretanto, existem várias dificuldades nesta determinação, uma vez, que até dentro da mesma espécie existem variações, o que pode ser exemplificado pelos estudos de Davis et al. (2011) e o presente estudo. Além disso, a determinação de prevalências dos filogrupos entre animais é mais complexa tendo em vista a grande variedade de espécies animais. A comparação filogenética entre cepas de *E. coli* isoladas de humanos e animais apresenta a dificuldade adicional que a maior parte destes estudos coleta as amostras em tempos e locais diferentes, não permitindo uma boa caracterização. (TENAILLON et al., 2010; ALM et al., 2011).

No presente trabalho, é interessante notar que as cepas do reto, apesar de portarem isolados de todos os grupos pesquisados, apresentaram maior abundância de cepas do grupo A, provavelmente indicando maior prevalência de cepas comensais entre elas. Cepas obtidas do abdômen/dorso foram exclusivamente do grupo A. Os isolados da boca se dividiram entre os grupos A, em sua maioria, e o grupo B₂, mostrando que albergam cepas comensais e também virulentas. Entretanto, entre os isolados da genitália externa, maior prevalência para cepas do grupo B₂ pode indicar maior presença de cepas ExPEC virulentas nesse sítio corporal, o que está de acordo com as altas incidências de infecções do trato urinário observadas (RUSSO; JOHNSON, 2000; JOHNSON et al., 200; FOXMAN et al., 2003; KAPER et al., 2004; OZUGUI, 2008; LISTER et al., 2009) e de afecções reprodutivas como piometra (AGOSTINHO et al., 2013), a partir de colonização dos tratos urinários e reprodutivo por cepas da genitália externa. A possibilidade de disseminação dessas cepas para o ambiente, outros animais ou humanos é considerada um risco, pois o filogrupo B₂, em geral, porta os quatro fatores de virulência de cepas uropatogênicas, codificados pelos genes *hly*, *kps*, *sfa* e *pap*, o que pode determinar afecções clínicas severas.

Pressões existentes no ambiente, assim como forças evolucionárias moldam a estrutura populacional de cepas comensais. Assim, pressões seletivas nos habitats das cepas comensais

podem coincidentemente promover a emergência de fatores de virulência e resistência antimicrobiana, transformando micro-organismos comensais em reservatórios de cepas virulentas e resistentes a antimicrobianos (TENAILLON et al., 2010; ALM et al., 2011). A resistência antimicrobiana ou a prevalência de integrons em bactérias de origem animal apresenta clara correlação positiva com a exposição do hospedeiro aos ambientes ocupados e/ou modificados pelo homem (SKURNIK et al., 2006). Essa relação entre resistência antimicrobiana com o ambiente do hospedeiro também é verificada entre populações humanas, sugerindo que a exposição de populações comensais de *E. coli* aos antibióticos molda sua diversidade em nível molecular. Cepas de *E. coli* do grupo filogenético A e algumas do grupo D são particularmente permissivas ao desenvolvimento de resistência a cefalosporinas de 3ª geração (MAMMERI et al., 2009; DESCHAMPS et al., 2009). Em compensação, cepas do grupo B₂ são menos resistentes que as outras cepas, não subsistindo na presença de antimicrobianos, independentemente do mecanismo molecular envolvido na aquisição da resistência e, ainda ocorre menor prevalência de integrons em cepas comensais de *E. coli* B₂, tanto em hospedeiros humanos, como animais. (PICARD; GOULLET, 1989; JOHNSON et al., 1994). Isto pode explicar a relativa baixa presença de cepas B₂ em animais domésticos aos quais antibióticos são usados extensivamente. (ANDREMONT, 2003; SKURNIK et al., 2005; TENAILLON et al., 2010).

No presente trabalho, maior prevalência de resistência antimicrobiana foi observada para as cepas do grupo filogenético A, com maior ocorrência entre as oriundas do reto. Esta observação é condizente com o conceito de que cepas comensais, em geral, portam mais frequentemente genes condicionadores de resistência antimicrobiana que as cepas virulentas. (TENAILLON et al., 2010).

A transmissão de bactéria resistente a antimicrobianos de animais de estimação para humanos representa um risco particular quando a cepa contém um grande número de genes codificadores de resistência ou quando expressa genes resistentes de relevância clínica em medicina humana, podendo resultar em falhas dos tratamentos. Considerando que os animais estão cada vez mais presentes nos lares, em contato caracterizado como de grande proximidade e, além disso, também presentes nas diversas modalidades de terapias assistidas por animais, frequentando ambientes como hospitais, asilos e escolas, estudos que elucidem o papel epidemiológico desses animais na disseminação de micro-organismos resistentes a antimicrobianos apresentam grande relevância pois, a partir dos conhecimentos dos riscos existentes, podem-se estabelecer melhores estratégias para contorná-los ao invés de privar os humanos dos inúmeros benefícios que o convívio com pets trazem. O presente estudo

mostrou a presença de cepas de *E.coli* resistentes em todos os sítios corporais investigados nas três populações de gatos estudados, o que aumenta o risco de disseminação de cepas MDR.

CONCLUSÃO

Foram isoladas cepas de *E. coli* em todos os sítios corporais pesquisados, distribuídas entre: reto (68,8%), genitália externa (vagina/prepúcio) (16,0%), boca (7,8%) e pele do abdômen/dorso (7,3%).

Cepas susceptíveis foram encontradas em todos os sítios corporais pesquisados, a maioria proveniente do reto, nas três populações pesquisadas, porém com maior prevalência na população SMP.

Altos percentuais de resistência foram encontrados para os betalactâmicos ampicilina, cefazolina e cefalotina em todas as populações, sendo maior prevalência verificada na população CSH em comparação com a população SMP, situação condizente com o alto consumo desses antibióticos na saúde humana, no Município de Ituverava.

Para ampicilina, cefazolina e tetraciclina foram encontradas maiores resistências entre as cepas retais e da genitália externa, com muita semelhança entre suas frequências.

Observaram-se, ainda, maiores semelhanças de resistência entre os isolados do reto e da genitália externa e entre os do abdômen/dorso e boca, de um modo geral. Para tetraciclina, as cepas da genitália externa apresentaram as maiores frequências de resistência, enquanto para aztreonam as cepas do dorso foram mais prevalentes.

Fenótipo de resistência *ESBL* (Extended Spectrum Betalactamase -Betalactamases de Espectro Estendido) foi encontrado em 0,86% da população.

As cepas apresentaram origem filogenética diversa, sendo encontrados os filogrupos A, B₁, B₂ e D nas cepas provenientes do reto. Para os isolados deste sítio corporal, houve semelhança nas frequências dos filogrupos A e B₂. O grupo A foi o único presente em todos os sítios corporais, enquanto cepas do grupo D somente foram encontradas no reto. O filogrupo B₁ somente ocorreu entre os isolados do reto e da genitália externa. Na boca somente foram observadas cepas dos grupos A e B₂, enquanto, no abdômen/dorso somente foram observadas cepas do grupo A.

Os filogrupos A e D apresentaram maior prevalência de resistência na população CSH, com maiores resistências para cepas retais. Cepas retais e da genitália externa apresentaram maiores semelhanças de resistência antimicrobiana.

A presença de cepas B₂, prováveis ExPEC no reto, na genitália e boca, alertam para a possibilidade de transmissão de cepas de *E. coli* virulentas.

Deve-se destacar o papel epidemiológico relevante de populações de gatos na disseminação de *E. coli* resistente a antimicrobianos, pois suas características etológicas propiciam uma grande interação com os arredores de suas residências, possibilitando um intercâmbio de micro-organismos de outros animais com os quais entram em contato, vários ambientes que exploram e humanos com quem convivem. Isto foi evidenciado pelos diferentes padrões de resistência antimicrobiana exibidos entre as diversas populações, caracterizadas em função de sua distância com locais onde o uso de antibióticos é rotineiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABES, 2000. **Sanitary and Environmental Engineering Brazilian Association**. Rio de Janeiro, RJ.

ABINPET – Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. <http://abinpet.org.br/imprensa/noticias/abinpet-divulgadados-mercado-pet-2013/> Acesso em 5 de março de 2015.

ABRAHAMIAN, F. M.; GOLDSTEIN, E. J. Microbiology of animal bite wound infections. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 24 (2), p.231-246, 2011.

AGOSTINHO, Juliana Maria Avanci. **Diversidade Genética, Fatores De Virulência E Perfis De Susceptibilidade A Antimicrobianos De Isolados De Escherichia Coli Provenientes Do Útero, Da Boca E Das Fezes De Cadelas Com Piometra**. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2013.

AGOSTINHO, J.M.A., SOUZA, A., SCHOCKEN-ITURRINO, R.P., BERALDO, L.G., BORGES, C.A., ÁVILA, F.A, MARIN, J.M., 2014. *Escherichia coli* strains isolated from the uteri horn, mouth and rectum of bitches suffering from piometra: virulence factors, antimicrobial susceptibilities, and clonal relationships among strains. **Int. J. Microbiol** article ID 979584, 8 pages.

ALM, E.W.; WALK, S.T.; GORDON, D.M. The niche of *Escherichia coli*. In : **Population Genetics of Bacteria**. Walk, S.T., and Feng, P.C.H. (eds). Washington, DC, USA: ASM Press, p. 107–123, 2011.

ANDREMONT, A. Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance. **ASM News**. v. 69, p. 601-607, 2003.

ANTUNES, C. M.; HAN, J; FERREIRA, R. B. LOLIC, P.; BORCHERS, C. H.; FINLAY, B. B. Effect of Antibiotic Treatment on the Intestinal Metabolome **Antimicrobial agents and chemotherapy**. p. 1494–1503, Apr. 2011.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. BRASIL. **Investigação e controle de bactérias multiresistentes**. [s.i]: ANVISA, 2007. 21 p. Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos (Gipea). Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde (GGTES).

ANVISA. Nota Técnica N. 1/2010: Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Online] 25 de Out. 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/> acesso em 20/12/ 2014.

APPA - American Pet Products Association. National Pet Owners Survey. [american pet products.org/Uploads/APPApubs/Background_Purpose_NPOS_2015_2016.pdf](http://americanpetproducts.org/Uploads/APPApubs/Background_Purpose_NPOS_2015_2016.pdf). Acesso em 5 de março de 2015.

ASKARIAN, M.; VAKILI, M.; KABIR, G. H. Hospital waste management status in university hospitals of the Fars province, Iran. **International Journal of Environmental Health Research**. v. 14, p. 295–305, 2004.

AUTHIER, S.; PAQUETTE, D.; LABRECQUE, O.; MESSIER, S. Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacterial isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart, **Can Vet J**. v. 47, p. 774-778, 2006.

BALL, K. R; RUBIN, J. E; CHIRINO-TREJO, M; DOWLING, P. M. Antimicrobial resistance and prevalence of canine uropathogens at the Western College of Veterinary Medicine Veterinary Teaching Hospital, 2002-2007. **Can Vet J**. v. 49 (10), p. 985-990, 2008.

BARKER, S.B. Therapeutic aspects of the human-companion animal interaction. **Psychiatrics Times**. Mineapolis, v. XVI, 1999.

BARRATT, D.G. Predation by house cats, *Felis catus* (L.), in Canberra, Australia. I. Prey composition and preference. **Wild life Research**. v. 24, p. 263–277. 1997.

BAUERNFEIND, A. J. M. Sequences of β -lactamasegenes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their aminoacid sequence swith those of other betalactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 2, p. 509-13, 1996.

BARRATT, D.G. Predation by house cats, *Felis catus* (L.), in Canberra, Australia. I. Prey composition and preference. **Wildlife Research**. v. 24, p. 263–277. 1997.

BECK, A.M. The ecology of stray dogs. West Lafayette, **Purdue University**, 1973, 98p.

BETTELHEIM, K.A. Non-O157 verotoxin-producing *Escherichia coli*: a problem, paradox, and paradigm. **Exp. Biol. Med.**, v. 228, p. 333–344, 2003.

BIRO, Z.; SZEMETHY, L.; HELTAI, M. Home range sizes of wildcats (*Felis silvestris*) and feral domestic cats (*Felis silvestris f catus*) in a hilly region of Hungary. **Mammalian Biology**. v. 69, p. 302–310. 2004.

BLACK, D.M.; S.C. RANKIN; L.G. KING. Antimicrobial therapy and aerobic bacteriologic culture patterns in canine intensive care unit patients: 74 dogs (January–June 2006). **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**. v. 19, p. 489-495, 2009.

BOGAARD, A. E. V. D.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents** 14:237-335, 2000.

BONNET, R.R.; SAMPAIO, J. L. M.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolatedin Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 7, p. 1936-42, 2000.

BORGES, Clarrisa Araújo. **Detecção de Escherichia coli shigatoxigênica (STEC) e enteropatogênica (EPEC) em carcaças e fezes de suínos abatidos na região de Ribeirão**

Preto – SP e perfil de susceptibilidade dos isolados frente a diferentes antimicrobianos. 43f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2011

BRANDES, S. The meaning of american pet cemetery gravestones. *Ethnology. University of California*, Berkeley, Usa, v. 48, n. 2, p.99-118, 2009. v. 48, nº 2, p. 99-118, 2009.

BRASIL. CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Farmácia não é um simples comércio: Antibióticos.** São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2011. 90 p.

BRASIL (Estado). Constituição (2005). Resolução nº 358, de 04 de maio de 2005. Gestão De Resíduos e produtos perigosos. **Dispõe sobre o Tratamento e a Disposição Final dos Resíduos dos Serviços de Saúde e dá outras Providência.** Seção 1, p. 63-65.

BRYAN, A; SHAPIR, N, SADOWSKY, M.J. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse , nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains, isolated from diverse human and animal sources. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 70, p. 2503-2507, 2004.

BUFFINGTON, C. A. T. External and internal influences on disease risk in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** (2002). V. 220, p. 994-1002.

BUFFINGTON, C. A. T. Comorbidity of interstitial cystitis with other unexplained clinical conditions. **Journal of Urology.** (2004). V. 172, p. 1242-1248.

BUFFINGTON, T.; WESTROPP, J. L.; CHEW, D. J.; BOLUS. R. R. Clinical evaluation of multimodal environmental modification (MEMO) in the management of cats with idiopathic cystitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, p. 261-268, 2006.

BUSCH, U.; HÖRMANSDORFER, S.; SCHRANNER, S.; HUBER, I.; BOGNER, K-H.; SING, A. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* excretion by child and her cat. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, n. 2, p. 348–349, Feb., 2007.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Update functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 3, p. 969-76, 2010.

CAMPERO, C.M.; CONOSCIUTO, G.; ODRIOZOLA, E. Hallazgos clínicos, bacteriológicos e histopatológicos em vaca lecheras, associados com problemas reprodutivos. **Revista Medicina Veterinária Buenos Aires**, v. 72, n. 6, p. 264-272, 1992.

CARATTOLI, A.; LOVARI, S.; FRANCO, A.; CORDARO, G.; DI MATTEO, P.; BATTISTTI, A. Extended-spectrum β - lactamase in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 833-835, 2005.

CARLSTEAD, K.; SHEPHERDSON, D. S. (2000) Alleviating stress in zoos with environmental enrichment. In: Moberg, G. P.; Mench, J. A. (eds), **The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare.** New York: CABI Publishing, pp. 337e354.

CARLSTEAD, K.; BROWN J.L.; MONFORT, S.L.; KILLENS, R.; WILDT, DE. (1992) Urinary monitoring of adrenal responses to psychological stressors in domestic and nondomestic felids. **Zoo Biology** v. 11, p. 165-176.

CARLSTEAD, K.; BROWN, J.L.; STRAWN, W. (1993) Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. **Applied Animal Behaviour Science** v. 38, p 143-158.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). USA. 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/HAI/organisms/cre/>>. Acesso em: 15 mar. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Multistate Outbreak of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* O121 Infections Linked to Raw Clover Sprouts (Final Update). Posted August 1, 2014 2:15 PM ET <http://www.cdc.gov/ecoli/2014/O121-05-14/key-resources.html>

CENTONZE, L. A.; LEVY, J. K. Characteristics of free-roaming cats and their caretakers. **J Am Vet Med Assoc.** v. 220, p. 1627–1633, 2002.

CHAGAS, T.P.G.; SEKI, L.M.; CURY, J.C.; OLIVEIRA, J.A.L.; DÁVILA, A.M.R.; SILVA, D.M.; ASENSI, M.D. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Appl. Microbiol.** v. 111, p. 572-581, 2011.

CHANG, X.; MEYER, M.T.; LIU, X.; ZHAO, Q.; CHEN, H.; CHEN, J.; QIU, Z.; YANG, L.; CAO, J.; SHU, W. Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. **Environ. Pollut.** 2010, v. 158 (5), p.1444–1450, 2010.

CHEESMAN, S.E; GUILLEMIN, K. We know you are in there: Conversing with the indigenous gut microbiota. *Res. Microbiol.* v. 158(1), p. 2-9, 2007.

CLARKE, S.C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* – an emerging problem? **Diagnostic Microbiology & Infectious disease.** V. 41, issue 3, p. 93-98, nov. 2001.

CLEFF, M.B.; XAVIER, M.O.; MARTINS, A.A. et al. Caracterización de la microbiota leveduriforme residente en la vagina de perras en diferentes fases del ciclo estral. **Arch. Med. Vet.**, v.39, p.153-158, 2007.

CLEMENTE, L.; MANAGEIRO, V.; FERREIRA, E.; JONES-DIAS, D.; CORREIA, I.; THEMUDO, P.; ALBUQUERQUE, T.; CANICA, M. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases among isolates of *Salmonella enterica subsp. enterica* from food-producing animals and Food products, in Portugal. **Int. J. Food Microbiol.** v. 167, p. 221–228, 2013.

CLEMETSON, L. L ; WARD, A.C.S. Bacterial flora of the vagina and uterus of healthy cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 6, p. 902-906, 1990.

CLERMONT, Olivier; BONACORSI, Stéphane; BINGEN, Edouard. **Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group.** 2000. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/66/10/4555#ref-list-1>>. Acesso em: 15 mar. 2015.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**. v.5 (1), p. 58–65, 2013.

CLIFTON, M. Counts finds 5 million a year. – AHA says 12 million. **Animal people.**, 1:8, 1993.

CLIFTON, M. Seeking the truth about feral cats and the people who help them. **Animal People.**; Nov: 1,7–10, 1992.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard M2-A9, 9th edn. CLSI, Wayne, PA, USA: CLSI; 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement M100 S20. Wayne, PA, USA: CLSI; 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fourth Informational supplement. CLSI document M100-S24 (ISBN 1-56238-897-5 [Print]; ISBN 1-56238-893 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2014.

CLUTTON-BROCK, J. Animal as Domesticates: a world view through the history / EUA, Michigan State University. Press. East Lansing, Michigan 48823-5245, 2012.

COSTA, D., POETA, P., SAENZ, Y., COELHO, A.C., MATOS, M., VINUE, L., RODRIGUES, J., TORRES, C. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. **Vet. Microbiol.** v. 127, p. 97-105, 2008.

CRF-SP. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. – São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2011. 90 p.; 28 cm. - (Projeto Farmácia Estabelecimento de Saúde; Fascículo VI)

CROWELL-DAVIS, S.; CURTIS T.M.; KNOWLES, R.J. Social organization in the cat: a modern understanding. **Journal of Feline Medicine & Surgery**, v. 6, n. 1, p. 19-28, 2004.

CUNHA, B. A. Antibiotic resistance. **Drugs of Today** 34:691-698, 1998.

CZECZULIN, J.R.; WHITTAM, T.S.; HENDERSON, I.R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J.P. Phylogenetic Analysis of Enteroaggregative and Diffusely Adherent *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2692-2699, 1999.

DA SILVA, C.E., HOPPE, A.E., RAVANELLO, M.M., MELLO, N. Medical waste management in the south of Brazil. **Waste Management** 25 (6), 600–605, 2004.

DAMANI, N. YEWE, P.; WALLACE, S. Antimicrobial Resistance and Infection Control. In: **2nd International Conference on Prevention and Infection Control (ICPIC 2013)** Geneva, Switzerland 2013, 2(Suppl 1):P111

DANTAS, Leticia Mattos de Souza. **Comportamento social de gatos domésticos e sua relação com a clínica médica veterinária e o bem-estar animal**. 2010. 139 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Clínica e Reprodução Animal, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010

DAVIES J, DAVIES D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 2010; 74:417–33.

DAVIS, J.A.; JACKSON, C.R.; FEDORKA-CRAY, P. J.; BARRETT, J.B.; BROUSSE, J.H.; GUSTAFSON, J.; KUCHER, M. Anatomical distribution and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from healthy companion animals. **Journal of Applied Microbiology**. V.110, p.597–604, 2011.

DESAI, A. R.; MUSIL, K. M.; CARR, A. P.; HILL, J. E. Characterization and quantification of feline fecal microbiota using cpn60 sequence-based methods and investigation of animal-to-animal variation in microbial population structure. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 120-128, 2009.

DESCHAMPS, C. et al. Multiple acquisitions of CTX-M plasmids in the rare D₂ genotype of *Escherichia coli* provide evidence for convergent evolution. **Microbiology** 155, 1656-1668. 2009.

DI CONZA, J. A.; GUTKIND, G. O. Integrones: los coleccionistas de genes. **Revista Argentina de Microbiología** (2010) 42: 63-78.

DIAS, Carlos Gabriel Almeida. **Estudo das relações materno-filiais em gatos domésticos (*Felis silvestris catus*): comportamento e controle olfatório**. 2009. 95 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2009.

DIAS, R. A.; GARCIA, R. C.; DA SILVA, D. F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F. Estimativa de populações canina e felina domiciliadas em zona urbana do Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 565-570, 2004.

DIAZ, L. F.; SAVAGE, G. M.; EGGERTH, L. L. Alternatives for the treatment and disposal of healthcare wastes in developing countries. **Waste Management**. v. 25, p. 626–637, 2005.

DÍAZ-MEJÍA, J. J.; AMABILE-CUEVAS, C. A.; ROSAS, I.; SOUZA, V. An analysis of the evolutionary relationships of integron integrases, with emphasis on the prevalence of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from clinical and environmental origins. **Microbiology**, v. 154, 94–102, 2008.

DOMINGOS, D. F.; SIQUEIRA, A.K.; PESSOA, M.L.T.M.; GARCIA, M.R.; LEITE, D.S. Detecção dos genes BLA TEM, - CTX-M e SHV e integrons de classes 1 e 2 em cepas de *Escherichia coli* isoladas de cães. In: **25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Resumo**, Pernambuco, nov. 2009

DRISCOLL, C. A.; MENOTTI-RAYMOND, M.; ROCA, A. L.; HUPE, K.; JOHNSON, W. E.; GEFFEN, E.; HARLEY, E. H.; DLEIBES, M.; PONTIER, D.; KITCHENER, A. C.; YAMAGUCHI, N.; O'BRIEN, S. J.; MACDONALD, D. W. The Near Eastern Origin of Cat Domestication. **Science**, v. 317, p.

EDWARDS, P.R.; EWING, W.H. **Identification of Enterobacteriaceae**, 3. ed. Minneapolis: Burges, 1972.

EDWARDS, C.A.; PARRET, A.M. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. **Br. J. Nutr.**, v. 88, n. 1, p.S11-S18, 2002.

EDWARDS, G. P.; DE PREU, N.; SHAKESHAFT, B. J.; CREALY, I. V.; PALTRIDGE, R. M. Home range and movements of male feral cats (*Felis catus*) in a semiarid woodland environment in central Australia. **Austral Ecology**. v. 26, p. 93–101. 2001.

ERRIDGE, C; DUNCAN, S. H; BERESWILL, S; HEIMESAAT, M. M (2010) The induction of colitis and ileitis in mice is associated with marked increases in intestinal concentrations of stimulants of TLRs 2, 4, and 5. **PLoS One** 5: e9125.

EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM -EARSS Annual Report 2008 On-going surveillance of *S. Pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. Disponível em http://www.nsih.be/ears-net/downloads1/2008_EARSS_Annual_Report.pdf, acesso em 20/02/15.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC) (Europa). **SURVEILLANCE REPORT: Antimicrobial resistance surveillance in Europe**. [s.i]: Ecdc, 2012. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Disponível em: <<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2015

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC) (Europa). **Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE)**. [s. L]: European Centre For Disease Prevention And Control, 2011. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/110913_Risk_assessment_resistant_CPE.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2015.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIESSLING, S.; ALT, K.; ANTÃO, E.M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIR, T.; BÖHNKE, U. ; STEINRÜCK, H. ; PHILIPP, H.C. ; WIELER, L.H. Avian pathogenic, uropathogenic, newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they ? **Int. J. Med. Microbiology.**, v. 297, p. 163-176, 2007.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Disorders of the penis and prepuce. In: **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2nd. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996. p. 691-696

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development--the failure of success? **Nat. Biotechnol.** v. 24, p. 1497-1503, 2006.

FERREIRA, G. A. Dieta e área de vida do gato doméstico *Felis silvestris catus* (LINNAEUS -1758) (carnívora, Felidae) em ambiente natural de Mata Atlântica na ilha comprida, Estado de São Paulo. Dissertação. Mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2011.

FITZGERALD, B. M., TURNER, D. C. Hunting behaviour of domestic cats and their impact on prey populations. In: TURNER, D.C.; BATESON, P. (Eds.), **The domestic cat: the Biology of its Behaviour**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2000. Cap. 8. p. 151-175.

FITZGERALD J.R. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of methicillin resistance. **Vet. Dermatol.** v. 20, p.490-495, 2009.

FONTES, L. C.; NEVES, P. R.; OLIVEIRA, S.; SILVAA, K. C. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo- β -lactamase SPM-1 and 16SrRNA methylase RmtD-1 in na urban river. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 6, p.3063-4, 2011.

FOXMAN, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. **Dis. Mon.** 49:53-70, 2003.

FUCHS, HANNELORE. *O animal em casa*: um estudo no sentido de desvelar o significado psicológico do animal de estimação. 1987. Tese (Doutorado em Psicologia) – Instituto de Psicologia. Universidade de São Paulo, p. 154, 1987.

GARRETT, M.; PARKER, J.; STEPHENS, C. M. Draft Genome Sequences of Antibiotic-Resistant Commensal *Escherichia coli*. **Genome Announc.** Santa Clara - California, p. 1-2. 04 dez. 2014.

GENOVESI, P.; BESA, M.; TOSO, S. Ecology of a feral cat *Felis catus* population in na agricultural area of northern Italy. **Wildlife Biology**. v. 1, p. 233-237. 1995.

GERHOLD, R. W.; JESSUP, D. A. Zoonotic diseases associated with free-roaming cats. *Zoonoses Public Health*. 2013 May; 60(3): 189-95. Doi: 10.1111/j. 1863-2378.2012.01522.x. Epub 2012 Jul 26.

GYLES, C.; FAIRBROTHER, J. *Escherichia coli* In: GYLES, C.; THOEN, O.; PRESCOTT, J.; (Editors). **Pathogenesis of bacterial infection in animals**. AMES. Iowa State University Press: p 193-214, 2004.

GOLTZ, D. M., HESS, S. C.; BRINCK, K. W.; BANKO, P. C.; DANNER, R. M. Home range and movements of feral cats on Mauna Kea, Hawaii. **Pacific Conservation Biology**. v.14, p. 177-184. 2008.

GRAVE, K.; LINGAAS, E.; BANGEN, M.; RONNING, M. Surveillance of the overall consumption of antibacterial drugs in humans, domestic animals and farmed fish in Norway in 1992 and 1996. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 43, 243-52. 1999.

GRUNDMANN, H.; LIVERMORE, D. M.; GISKE, C. G.; CANTON, R.; ROSSOLINI, G. M.; CAMPOS, J. et al. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. **Euro Surveillance**, 15:46. 2011.

GUARNER, F., MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, p. 512-519, 2003.

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

GUIDO, M. C.; PAZ, R. C. R.; COSTA, E. O.; ZÜGE, R. M.; BENITES, N. R.; BARNABÉ, V. H.; BARNABÉ, R. C. Microbiota prepucial e vaginal de felinos neotropicals mantidos em cativeiro. In: CONBRAVET. Disponível em: http://eagaspar.com.br/mcguido/conbravet_2000.htm. Acesso em 28/02/2015

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, Ribeirão Preto-SP, v. 33, n. 3, p.667-679, 24 fev. 2010. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

GUTMANN, L.; FERRE, B.; GOLDSTEIN, F. W.; RIZK, N.; PINTO-SCHUSTER, E. E.; ACAR, J. F. et al. SHV-5, a novel SHV-type β -lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 33, n. 6, p. 951-6, 1989. Apud SILVA; LINCOPAN, 2012.

HAMMERMUELLER, J.; KRUTH, S.; PRESCOTT, J.; GYLES, C. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. **Can. J. Vet. Res.**, v. 59, p. 265-270, 1995

HARPER, G. A. Feral cats on Stewart Island/Rakiura: population regulation, home range size and habitat use. **DOC Science Internal Series, New Zealand Department of Conservation**, v.174, p. 1-35. 2004.

HAAG, L-M.; FISCHER, A.; OTTO, B.; PLICKERT, R.; KÜHL, A. A., et al. (2012) Intestinal Microbiota Shifts towards Elevated Commensal *Escherichia coli* Loads Abrogate Colonization Resistance against *Campylobacter jejuni* in Mice. **PLoS ONE** 7(5): e35988. doi: 10.1371/journal.pone.0035988

HO, P. L.; WONG, R. C.; CHOW, K. H.; QUE, T. L. Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and Food-producing animals. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, p. 627-634, 2009.

HOLANDA, A. A. R.; FERNANDES, A. C. S.; BEZERRA, C. M.; FERREIRA, M. A. F.; HOLANDA, M. R. R.; HOLANDA, J. C. P., et al. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v.29, p.3-9, 2007.

HUANG, J.J., HU, H.Y., LU, S.Q., LI, Y., TANG, F., LU, Y., WEI, B. Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. **Environ. Int.** v.42, p. 31-36, 2012.

HUPPERTZ, H.I.; RUTKORWSKI, S.; ALEKSIC, S.; KARCH, H. Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe. **Lancet**, v. 349, p. 1660-1662, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE- Ituverava. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/temas> acesso em 24/02/2015.

JACOBY, G. A. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamases. **Clinical Infectious Diseases** 27:81-83, 1998.

JACOBY, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005 Jul 15; 41 Suppl2: S1206. Disponível em: <http://www.journals.uchicago.edu/CID/journal/issues/v41nS2/34937/34937.web.pdf>. Acesso em: 15/03/2015

JACOBY, G. A. AmpC β -lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 1, p. 161-82, 2009.

JARDIM, W.R.R.; VICENTE, W.R.R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. Avaliação da microbiota vaginal, em fêmeas felinas adultas, durante as fases do ciclo estral. In: **ANAIS DO IV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**; Araçatuba: UNESP, v. único, p. 103-104, 1992.

JOHNSON, J. R.; GOULLET, P.; PICARD, B.; MOSELEY, S. L.; ROBERTS, P. L.; STAMM, W. E. Association of carboxylesterase B electrophoretic pattern with presence and expression of urovirulence factor determinants and antimicrobial resistance among strains of *Escherichia coli* that cause urosepsis. **Infect. Immun.** 59, 2311-2315. 1991.

JOHNSON J. R.; JEROME, C.; BOSTER, D. R.; STAPLETON, A. E.; TARR, P. I. O, K, and H antigens predict virulence factors, carboxylesterase B pattern, antimicrobial resistance, and host compromise among *Escherichia coli* strains causing urosepsis. **J. Infect. Dis.** 169, 119-126. 1994

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. **J Infect Dis.** v. 181 (1), p. 261-272. 2000.

JOHNSON, J. R.; O'BRYAN, T.T.; LOW, D.A.; LING, G.; DELAVARI, P.; FASCHING, C.; RUSSO, T.A; CARLINO, U.; STELL, A.L. Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express *papG* allele III. **Infect. Immun.** 68 (6): 3327-36, 2000.

JOHNSON, J. R.; DELAVARI, P.; STELL, A. L.; WHITTAM, T. S.; CARLINO, U.; RUSSO, T. A. Molecular comparison of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of the same electrophoretic lineages from humans and domestic animals. **Journal of Infectious Disease**, v.183, p.154-159, 2001.

JOHNSON, C.A. Distúrbios do sistema reprodutivo. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. *Medicina interna de pequenos animais*. 3ed. Ed Roca; 2006. p 811-911.

JOHNSON, J.R; OWENS, K; GAJEWSKI, A.; CLABOTS, C. *Escherichia coli* colonization patterns among human household members and pets, with attention to acute urinary tract infection. **Journal of Infectious Disease**, v. 197, p. 218-224, 2008.

JOHNSON, J.R; MENARD, M; JOHNSTON, B; KUSKOWSKI, M.A; NICHOL, K; ZHANEL, G.G. Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, p. 2733-2739, 2009.

JUSTEN, H. Clínica Veterinária Amiga do Gato. **Revista CFMV**. Brasília DF. Ano XX nº 62 Maio a Agosto, 2014.

KAHN, C. M.; LINE, SCOTT. **The Merck veterinary manual**. NJ, 10ed. 2010.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev.**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KARAMI, N.; MARTNER, A.; ENNE, V. I.; SWERKERSSON, S.; ADLERBERTH, I.; WOLD, A. E. Transfer of an ampicillin resistance gene between two *Escherichia coli* strains in the bowel microbiota of an infant treated with antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**: Oxford University. [s.i], p. 1142-1145. 03 set. 2007.

KAUFFMANN, F. The Serology of the *Coli* Group. **The Journal of Immunology**. September 1, 1947 v. 57 no. 171-100.

KESKIMAKI, M.; EKLUND, M.; PESONEM, H.; HEISKANEM, T.; SIITONEM, A. The study group. SPEC, EAEC, and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diag. Microbial. Infect. Dis.** V.40, p.151-156, 2001.

KIRATISIN, P., APISARNTHANARAK, A., LAESRIPA, C.; SAIFON, P. (2008). Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. **Antimicrob Agents Chemother** 52, 2818–2824.

KNOTHE, H.; SHAH, P. KRCMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315-7, 1983. Apud SILVA; LINCOPAN, 2012.

KOOLIVAND, A.; MAHVI, A. H.; ALIPOOR, V.; AZIZI, K.; BINAPOUR, M. Investigating composition and production rate of healthcare waste and associated management practices in Bandar Abbass, Iran. **Waste Manage. Res.**, v. 30 (6) pp. 601–606, 2012.

KOOLHAAS, J.M.; KORTE, S.M.; DE BOER, S.F.; VAN DER VEGT, B.J.; VAN REENEN, C.G.; HOPSTER, H.; DE JONG, I. C.; RUIS, M. A. W.; BLOKHUIS, H. J (1999) Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** V. 23, P. 925-935.

KONEMANN E.W., ALLEN S.D., JANDA W.D., SCHRECKENBERGER P.C.; WINN W.C. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia, Pennsylvania: **Lippincott Williams & Wilkins Publ.**, 1997.

KORZENIEWSKA, E.; HARNISZ, M. Extended-spectrum beta-lactamase (*ESBL*)-positive *Enterobacteriaceae* in municipal sewage and their emission to the environment. **Journal of Environmental Management**. [s.l], p. 904-911. 24 jun. 2013.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types. **Vet. Microbiol.**, v. 106, p. 87-95, 2005.

KRUMPERMANN, P. H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *E. coli* to identify high risks sources of faecal contamination of foods. **Appl. Environ Microbiol.** v. 46, p 165-170.

KUHNERT, P., BOERLIN, P. E FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolated from water, food or environment. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, p. 107-117, 2000.

KUNZ, T.L.; GAMBARINI, M.L.; OLIVEIRA FILHO, B.D.; GALINDO, A.D.S. Mortalidade embrionária em bovinos: inter-relações embrião-patógenos. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n. 8, p. 28-36, 2002.

LAGES, Sonia Luisa Silva. **Avaliação da população de cães e gatos com proprietário, e do nível de conhecimento sobre a raiva e posse responsável em duas áreas contrastantes da cidade de Jaboticabal, São Paulo.** 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, UNESP, Jaboticabal, 2009.

LANCENDORFER, K. M.; ATKIN, J. L.; REESE, B. B. Animals in advertising: Love dogs? Love the ad. **Journal of Business Research** 61 (2008) 384–391

LANGHAM, N. P. E.; PORTER, R. E. R.: Feral cats (*Felis catus L.*) on New Zeland Farmland. I. Home Range. **Wildlife Research**. v. 18, n. 6, p. 741-760. 1991.

LEITE-MARTINS, L.R., MAHÚ, M.I.M., COSTA, A.L., MENDES, A., LOPES, E., MENDONÇA,D.M.V., NIZA-RIBEIRO, J.J.R., MATOS, A.J.F., COSTA, P.M.Prevalence of antimicrobial resistance in enteric *Escherichia coli* from domestic pets andassessment of associated risk markers using a generalized linear mixed model. **Preventive Veterinary Medicine**, article in press, 2014.

LEONARD, E.K., PEARL, D.L., FINLEY, R.L., JANECKO, N., REID-SMITH, R.J., PEREGRINE, A.S., WEESE, J.S., 2012. Comparison of antimicrobial resistance patterns of *Samonellaspp* and *Escherichia coli* recovered from pet dogs from volunteer households inOntario 92005-06). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67, 174-181.

LEUNG, K.Y.; SIAME, B.A.; TENKINK, B.J.; NOORT, R.J.;MOK, Y.K. Edwardsiella tarda – virulence mechanisms of an emerging gastroenteritis pathogen. **Microbes Infect.** v. 14, p. 26–34, 2012.

LEVY, J. K.; WOODS, J. E.; TURICK, S. L.; ET AL. Number of unowned free-roaming cats in a college community in the southern United States and characteristics of community residents who feed them. **J Am Vet Med Assoc.** 2003; v. 223:202–205

LEVY, K. J. DVM; CRAWFORD, P. C. Humane strategies for controlling feral cat populations. In: Animal Welfare Forum: Management of Abandoned and Feral cats JAVMA, Vol 225, No. 9, 2004

LEY, R.E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; TURNBAUGH, P.J.; RAMEY, R.; BIRCHER, J.S.; SCHLEGEL, M.L.; TUCKER, T.A.; SCHRENZEL, M.D.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. **Science** 20 June: Vol. 320. no. 5883, pp. 1647 – 1651, 2008.

LIÉVIN, V.; PEIFFER, I; HUDAULT, S.; ROCHAT, F.; BRASSART, D.; NEESER JR, SERVIN, A. L. Bifido bacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. **Gut Pathogens**, 47:646-52. 2000.

LIBERG, O; SANDELL, M.; PONTIER, D; NATOLI, E. Density, spatial organization and reproductive tactics in the domestic cat and other felids. In: TURNER, D.C.; BATESON, P. **The domestic cat: The biology of its behaviour**. 2. ed. Cambridge University Press, Cambridge. 2000. Cap. 7. p. 119–148.

LISTER R; PELIZZOLA M; DOWEN RH; HAWKINS, R.D; HON, G; TONTI, Filippini J; NERY JR; LEE, L; YE, Z; NGO, Q.M; EDSALL, L; ANTOSIEWICZ, Bourget J; STEWART, R; RUOTTI, V; MILLAR A.H; THOMSON, J.A; REN, B; ECKER, JR. **Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences**. 2009. 462(7271):315-22. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19829295>>. Acesso em: 21 abr. 2015.

LIVERMORE, D. M. Fourteen years in resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.39, p. 283–294, 2012.

LOPES, A. C. *bla* (CTX-M-2) and *bla* (CTX-M-28) Extended spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 163-7, 2010.

MAGILL, S. S; JONATHAN, R. E.; STAT, M.; BAMBERG, W.; ZINTARS, G. B.; GHINWA, D.; MARION, A. K.; RUTH, L. ; MEGHAN, M.; MCALLISTER-HOLLOD, L.; NADLE, J.; RAY, S. M.; THOMPSON, D. L.; WILSON, L. E.; FRIDKIN, S. F. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. **The New England Journal of Medicine**. v. 370, p. 1198-1208, 2014. http://healthcareinnovation.sodexo.com/pdf/201411/201411_NEJM.pdf acesso em 13/02/2015.

MAMMERI, H., GALLENI, M., NORDMANN, P. Role of the Ser-287-Asn replacement in the hydrolysis spectrum extension of AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 53, p. 323-326, 2009.

MANNING, A. M.; ROWAN, A. N. Companion animal demographics and sterilization status: results from a survey in four Massachusetts towns. **Anthrozoos**. v.5, p. 192–201, 1992.

- MANSOURI, S.; ABBASI, S. Prevalence of multiple drug resistant clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Southeast Iran. **Iran J. Med. Sci.** v.35, p.101-108, 2010.
- MARTIN, C.; ROUSSET, E.; DE GREVE, H. Human uropathogenic and bovine septicaemic *Escherichia coli* strains carry an identical F17-related adhesin. **Res. Microbiol.**, v.148, p.55-64, 1997.
- MARTINS, L. R.; PINA, S. M.; SIMÕES, R. L.; DE MATOS, A. G.; RODRIGUES, P.; DA COSTA, P. M. Common phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns found in a case study of multiresistant *E. coli* from cohabitant pets, humans, and household surfaces. **J. Environ Health.** v. 75 (6), p. 74-81, 2013.
- MAYER, H.B.; WANKE, C.A. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a possible cause of diarrhea in an HIV-infected patient. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 273-274, 1995.
- MAZCORRO, J. F. G.; MINAMOTO, Y. Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review. **Arch Med Vet**, [s.l], n. 45, p.111-124, 2013.
- MBONGWE, B., MMEREKI, B., MAGASHULA, A. Healthcare waste management: current practices in selected healthcare facilities, Botswana. **Waste Management.** v. 28 (1), p. 226–233, 2008.
- MEEK, P.D. Home range of house cats *Felis catus* living within a National Park. **Australian Mammalogy.** v. 25, p.51-60. 2003.
- MELO, Luana Claudino. Microbiota Comensal de Animais de Companhia como Reservatório de Genes Condicionadores de B-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) e Resistência a Quinolona Mediada por Plasmídeos (PMQR). 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- MIDVEDT A.C.; CARLSTEDT-DUKE, B.; NORIN, K.E.; SAKERHOLT, H.; MIDVEDI, T. Development of five metabolic activities associated with the intestinal microflora of healthy infants. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 7, p. 559-567, 1988.
- MITNOVESKY, S.; KIMBLE, F. Cat bites of the hand. **ANZ Journal of Surgery.** v. 74, p. 859-862, 2004.
- MORATO, E.P.; LEOMIL, L.; BEUTIN, L.; KRAUSE, G.; MOURA, R.A.; CASTRO, A.F.P. Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* Types. **Zoonoses Public Health**, v. 56, p. 229-237, 2008.
- MOLSHER, R.; DICKMAN, C.; NEWSOME, A.; MULLER, W. Home ranges of feral cats (*Felis catus*) in central-western New South Wales, Australia. **Wildlife Research.** v. 32, p. 587–595. 2005.

MOYAERT, H., DE GRAEF, E.M., HAESEBROUCK, F., DECOSTERE, A. Acquired antimicrobial resistance in the intestinal microbiota of diverse cat populations. **Research in Veterinary Science**. v. 81, p. 1-7, 2006.

MUNIZ, Igor Mansur. **Distribuição de espécies e perfil genotípico da resistência antimicrobiana em *staphylococcus sp* isolados da cavidade oral de gatos**. 2012. 98 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Clínica e Reprodução Animal, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012.

MURPHY, C; REID-SMITH, R.J; PRESCOTT, J.F; BONNET, B.N; POPPE, C; BOERLIN, P; WEESE, J.S; JANECKO, N. Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: a preliminary study. **Can. Vet. J.**, v. 50, p. 1047-1053, 2009.

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L.; EDWARDS, J.F. Sistema Reprodutor Masculino. In: SANTOS, R.L.; ALESSI, A. C. **Patologia Veterinária**. 1 ed. Roca 2011. p. 855-880.

NATARO, J.P.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.D.; VIAL, P.A.; SEARS, C.L. T84 células em cultura como um modelo para enterogregativa *Escherichia coli* patogênese. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 4761-4768, 1996.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Ver.** v. 11, p. 142–201.

NAVANEETHAN, U.; RALPH, A.G.; Mechanisms of infectious diarrhea. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. v.5, 637-647. nov. 2008.

NORDMANN, P., CUZON, G., NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet. Infect. Dis.** v. 9, p.228–236, 2009.

NORDMANN, P.; POIREL, L.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T.R. Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**; 66:689–92. 2011.

NOWROUZIAN, F. L.; OSTBLOM, A. E.; WOLD, A. E.; ADLERBERTH, I. Phylogenetic group B2 *Escherichia coli* strains from the bowel microbiota of Pakistani infants carry few virulence genes and lack the capacity for long-term persistence. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 15, p. 466–472, 2009.

NUSSBAUM, F.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HÄBICH, D.; **Angew. Chem., Int. Ed.** 2006, 45, 5072. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16881035>. Acesso em: 14/02/2015

NUTTER, F. B. LEVINE, J. F. STOSKOPF, M. K. Reproductive capacity of free-roaming domestic cats and kitten survival rate. **J Am Vet Med Assoc.**, 225:1399–1402, 2004.

OCHMAN, H; LAWRENCE, J.G; GROISMAN, E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, p. 299-304, 2000.

OLIVA, S. A terapia assistida por animais: o papel do médico veterinário. **Boletim Informativo ANCLIVEPA-SP**, São Paulo, n. 35, 2004.

OLIVEIRA, C. F. *et al.* Prevalência das famílias TEM, SHV, CTX-M de β -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* no Hospital Universitário de Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 5, p. 556-60, 2009.

OSUGUI, Lika. **Pesquisa e Caracterização de Amostras de ExPEC (“Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*”) Isoladas de Infecções do Trato Urinário (ITU) de Cães e Gatos**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, 2008.

PATON, D. C. **Developing a community-based feral cat control program for Kangaroo Island**. Presentation from a meeting held on 18 February 2003 to discuss the problem of feral cats on Kangaroo Island. (Pelican Lagoon Research Centre: Kangaroo Island, South Australia.). 2003. Disponível em: <http://www.echidna.edu.au/projects/feral/feral_paton.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2015.

PATRONECKY, G. J.; ISLAVINSKY, S. A. Zoonosis updates. **Journal of the American veterinary medical association**. v. 234, n. 3, p. 336-345, 2009.

PAULA, C.J.S., MARIN, J.M. Isolation of extraintestinal, pathogenic *Escherichia coli* from diarrheic dogs and their antimicrobial resistance profile. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, p. 498-500, 2008.

PESSOA, G.V.A.; SILVA, E.A.M. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 32, p. 97-100, 1972.

PESSOA, C. A. **Avaliação da microbiota bacteriana e fúngica presente na cloaca de jabutis (*Geochelone carbonaria*) criados em domicílio e análise do potencial risco à saúde humana**. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, 96 f., 2009.

PICARD, B.; GOULLET, P. Correlation between electrophoretic types B₁ and B₂ of carboxylesterase B and sex of patients in *Escherichia coli* urinary tract infections. **Epidemiol. Infect.** v. 103, p. 97 – 103, 1989.

POPISCHIL, A.; MAINIL, J.G.; BALJER, G.; MOON, H.W. Attaching and effacing bacteria in the intestines of calves and casts with diarrhea. **Vet. Path.**, v.24, p. 330-334, 1987.

PRADO, T.; PEREIRA, W.C.; SILVA, D.M.; SEKI, L.M.; CARVALHO, A.P.; ASENSI, M.D. Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 46, p. 136-141, 2008.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. Em **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**; Taft, C. A., ed.; Research Signpost: Kerala, 2006, cap. 4.

PUBLIC HEALTH (Michigan). **Veterinary Public Health**. 2011. Disponível em: <<http://amrls.cvm.msu.edu/veterinary-public-health-module/tools/module-pdf-files/vet-public-health>>. Acesso em: 21 abr. 2015.

RADHOUANI, H.; SILVA, N.; POETA, P.; TORRES, C.; CORREIA, S.; IGREJAS, G.. Potential impact of antimicrobial resistance in wild life, environment and human health. **Front Microbiol**. 5:23. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00023>

RANG, H.P; DALE, M.M; RITTER, J.M; FLOWER R.J. **Farmacologia**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RASTALL, R. A. Bacteria in the Gut: Friends and Foes and How to Alter the Balance. In: WALTHAM International Science Symposium: Nature, Nurture, and the Case for Nutrition. **The Journal of Nutrition**, American Society for Nutritional Sciences, 134 (8): 2022S-2026S, 2004

RAWAT, D.; NAIR, D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram negative bacteria. **J Glob Infect Dis**, v. 2, n. 3, p. 263-74, 2010.

ROBINS- BROWNE, R.M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* infantile diarrhea. **Rev. Infecta. Diz**, v. 9, p. 28-53, 1987.

ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 17, p. 467-475, 2002.

ROCHA, S. **Cinoterapia**: A terapia assistida por cães ajuda crianças, adolescentes e idosos a superarem seus limites. 2005. Disponível em: http://www.acesa.com/viver/arquivo/vida_saudavel/2005/06/15-cinoterapia/. Acesso em: 15 abril de 2015.

ROCHLITZ, I. A. Review of the housing requirements of domestic cats (*Felis silvestris catus*) kept in the home. **Applied Animal Behaviour Science**. v. 93, p. 97-109, 2005.

RODRIGUES, D. P.; THEOPHILO, G. N. Dom; REIS, E. M. F.; LAZARO N. S. Doenças de Transmissão Alimentar: Aspectos Clínicos, Coleta e Transporte de Material. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Lab. Ref. Nacional Cólera e outras Enteropatógenas. **Man. Lab. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ**, 2008. 27p.

RODRIGUES, Renata Santos - Caracterização de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) típica e atípica isoladas de crianças com gastroenterite aguda na região de Porto Velho – RO. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Fundação Universidade Federal de Rondônia/UNIR, Porto Velho, 2013. 74f.

ROLAIN, J. M.; CANTON, R.; CORNAGLIA, G. Emergence of antibiotic resistance: need for a new paradigm. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 18, p. 615–6, 2012.

RUBIN, J. E.; CHIRINO-TREJO, M. Antimicrobial susceptibility of canine and human *Staphylococcus aureus* collected in Saskatoon, Canada. **Zoonoses and public health**. v. 58, n. 7, p. 454-462, nov. 2011.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J Infect Dis.**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754, May, 2000.

SANCHEZ, S.; MCCRACKIN STEVENSON, M. A.; HUDSON, C.R.; MAIER, M.; BUFFINGTON, T.; DAM, Q.; MAURER, J. J. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infection in dogs. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p. 3586-3595, 2002.

SANDERS, C. C.; SANDERS, W.E., JR. B-lactam resistances in Gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases* 15, 824-39. 1992.

SANTINI, FERNANDO DE OLIVEIRA. **Uma Análise da Influência Da Promoção de Vendas de Desconto na Intenção de Compra do Consumidor e os Efeitos Moderadores da Atratividade.** Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Administração, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2013.

SANTOS, T. S.; ANTUNES, A. A.; CARVALHO, R. W. F.; AVELAR, R. L.; MELO, R. E. V. A.; DOURADO, E. Perfis dos pacientes vítimas de mordeduras faciais: um estudo retrospectivo. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v.55, n.4, p.369-373, 2007.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; VICENTE, W.R.R.; TONIOLLO, G.H.; JARDIM, J.P.C.; BERCHIELLI, S.C.P. *Estudo microbiológico da vagina de felinas adultas.* IN: **ANAIS DO XIV ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS**; Jaboticabal: UNESP, v. único, p. 97-97, 1992.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; VICENTE, W.R.R.; TONIOLLO, G.H.; JARDIM, J.P.C.; PUGLIESES, A. C. *Bactérias patogênicas isoladas na microbiota vaginal de gatas (Felis catus) consideradas clinicamente saudáveis.* In: **ANAIS DO XIV ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS**; Jaboticabal: UNESP, v. único, p. 97-97, 1992.

SCOTT, P. S. **Surviving Alzheimer's**: Practical tips and soul-saving wisdom for caregivers. San Francisco. 368 p. 1st ed, 2013.

SHEPHERDSON, D.J.; CARLSTED, K. Alleviating Stress in Zoo Animal with Environmental Enrichment. In: SHEPHERDSON, D.J.; CARLSTED, K. **The Biology of Animal Stress: basic principles and implications for animal welfare.** California: CABI Publishing, p. 337-350, 2000.

SILVA, C. H. P. M.; SALVINO, C. R. Importância do Reconhecimento das Enterobactérias Hospitalares Produtoras de Beta-lactamases de Espectro Estendido (*ESBL*) e suas Implicações Terapêuticas. **NewsLab** (41): 104-112, 2000.

SILVA, K. C.; KNOBEL, T.; MORENO, A. M. Resistência a antimicrobianos em medicina veterinária: mecanismos e agentes bacterianos de maior impacto em saúde humana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Brasil, v. 50, n. 3, p. 171-183, jun. 2013. ISSN 1678-4456. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/64538>>. Acesso em: 19 Jan. 2015.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **J Bras Patol Med Lab.** v. 48, n. 2, p. 91-99, abril 2012.

SILVA, C.E. Da; HOPPE, A. E; RAVANELLO, M. M; MELLO, N. Medical wastes management in the south of Brazil. **Wast Management.** Santa Rosa-RS, v.25, p.600-605, 2005.

SILVA, K. C. *et al.* Dissemination of CTX-M-2-type Extended spectrum β -lactamase-producing *Salmonella spp.* in poultry farms in Brazil. In: **50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 50, Boston, EUA. *Anais*: divulgação digital, C2 687, Boston: ICAAC, 2010.

SKURNIK, D; RUIMY, R.; ANDREMONT, A.; AMORIN, C.; ROUQUET, P.; PICARD, B.; DENAMUR, E. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. **J.Antimicrob. Chemother.** 57, 1215-1219. 2006.

SIMNER, P. J.; ZHANEL, G.G.; PITOUT, J.; TAILOR, F.; McCRACKEN, M.; MULVEY, M.R.; PHILIPPE, R.S.; LAGACÉ-WIENS.; HEATHER, J. A.; DARYL, J. H. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase- and AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli*: results of the CANWARD 2007–2009 study. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** v. 69, p. 326–334, 2011.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M. GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 4, p. 134- 63, 2007.

SOUZA, C. A. I; SCARELLI, E. Agressão por microrganismos de microbiota endógena, **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v.67, n.2, p.275-281, 2000.

SOUZA, C.P. The strategies of *Escherichia coli* pathotypes and health surveillance. **Brazilian Journal of Health Surveillance**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 65-70, 2005.

STORTEBOOM, H.; ARABI, M.; DAVIS, J. G.; CRIMI, B.; PRUDEN, A. Identification of antibiotic-resistance-gene molecular signatures suitable as tracers of pristine river, urban, and agricultural sources. **Environ. Sci. Technol.** v. 44, p. 1947–1953, 2010.

SUARÉZ, C.; GUDIOL, F.; Antibioticos Betalactámicos. **Enferm. Infecc. y Microbiol. Clin.** v. 27, p. 116-129, 2009.

SUCHODOLSKI, J. S. 2011. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.** v. 4, p.261-272.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli* in human and animal disease. The virulence of *Escherichia coli*. **Oxford: Academic**, 1985. p.7-45.

SUTHAR, N; ROY, S; CALL, D. R.; BESSER, T. E.; DAVIS, M. A. An Individual-Based Model of Transmission of Resistant Bacteria in a Veterinary Teaching Hospital. *PLoS One*. 2014; 9(6): e98589. Published online 2014 Jun 3. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles>> Acesso 115/02/2015.

SZMOLKA, A., NAGY, B., 2013. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. **Frontiers in Microbiology** 4, article 258.

TANNOCK, G.W. The normal microflora: an introduction. In: TANNOCK, G.W. (ed.). Medical importance of normal micro-flora. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 1-23.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, p. 816, 2001.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 33 (3): 281-301, mai-jun, 2000.5.

TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos para o clínico**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2006.

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

TENNENT, J.; DOWNS, C.T. Abundance and home ranges of feral cats in na urbanconservancy where there is supplemental feeding: a case study from South Africa. **African Zoology**. v. 43, p. 218–229. 2008.

TETTEH-QUARCOO, P. B.; DONKOR, E. S.; ATTAH, S. K.; DUEDEU, K. O.; AFUTU, E.; BOAMAH, I.; OLU-TAIWO, M.; ANIM-BAIDOO, I.; AYEK-KUMI, P. F.; Microbial Carriage of Cockroaches at a Tertiary Care Hospital in Ghana. **Environmental Health Insights**. 2013;7 59–66. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em 23/02/2015.

THEA, D.M.; ST LOUIS, M.E.; ATIDO, U.; KANJINGA. K.; KEMBO, B.; MATONDO, M.; TSHIAMALA, T.; KAMENGA, C.; DAVACHI, F.; BROWN, C. A prospective study of diarrhea and HIV-1 infection among 429 Zairian infants. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 1696-1702, 1993.

THEURETZBACHER, U. Global antibacterial resistance: The never-endingstory. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**. 1 p. 63–69, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª ed. Ed. Artmed, 2012. 240 pp.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis** 8: 508-513.

TRAVERSE, M.; ACETO, H. Environmental Cleaning and Disinfection. **Vet Clin Small Anim**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.11.011>. Acesso em 12/01/2015.

VAN DEN BOGAARD, A.E.J.M.; STOBBERINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 14, p. 327-335, 2000.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 1, p. 191-198.

VASCONCELLOS, francielli Mahnic – Estudo do padrão de adesão agregativa de *Escherichia coli* do sorotipo O142:H34. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo- USP. Instituto Butantan/IPT, 2014.

VERTEGEN, J. Reprodução em felinos. Ettinger, S. J; FELDMAN, E.C. Tratado de Medicina Veterinária Interna. Doenças do cão e do Gato. 5ed, v2, Guanabara-koogan, 2008. p1670-1684.

VIGNE, J. D.; GUILAINE, J.; DEBUE, K.; HAYE, L.; GÉRARD, P. Earling Taming of the Cat in Cyprus. **Science**, v. 304, n.9, p.259, 2004.

VOLPATO, R.; RAMOS, R. S.; MAGALHÃES, L. C. O.; LOPES, M. D.; SOUZA, D. B. Afecções do pênis e prepúcio dos cães - revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 3, n. 17, p.312-323, 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.

WALSH, C.; Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. **ASM Press**: Washington, 2003.

WARREN, A.L.; TOWNSEND, K.M.; KING, T. MOSS, S.; O'BOYLE, D.; YATES, R.M.; TROTT, D.J. Multi-drugresistant *Escherichia coli* extended-spectrum B-lactamase activity and fluoroquinolone resistance isolated from clinical infections in dogs. **Aust. Vet. J.**, v. 79, p. 621-623, 2001.

WEINBERG, A. N.; BRANDA, J. A. Case records of Massachusetts General Hospital. Case 31-2010. A 29 year-old-woman with fever after a cat bite. **The New England Journal of Medicine**. 14; 363 (16): 1560-8. 2010.

WESTLING, K.; FARRA, A.; CARS, B.; EKBLÖM, A.G.; SANDSTEDT, K.; SETTERGREN, B.; WRETLIND, B.; JORUP, C. Cat bite wound infections: a prospective clinical and microbiological study at three emergency wards in Stockholm, Sweden. **Journal of Infection**, v.53, p.403-407, 2006.

WESTROPP, J. L.; BUFFINGTON, C. A. T. (2004). Feline idiopathic cystitis: current understanding of pathophysiology and management. **Veterinary Clinics of North America e Small Animal Practice**. v.34, p. 1043-1055.

WHO. World Health Organization. The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action. 2012.

WIDMAN, D. R.; ABRAHAMSEN, G. C.; ROSELLINI, R. A. (1992). Environmental enrichment - the influences of restricted daily exposure and subsequent exposure to uncontrollable stress. **Physiology and Behavior**. V.51, p. 309-318.

WILFERT, C. M. *E. coli* meningitis: K1 antigen and virulence. **Annu. Rev. Med.**, v.29, p.129-136, 1978.

WOOD, L.; GILES-CORTI, B.; BULSARA, M. The pet connection: pets as a conduit for social capital? **Social Science & Medicine**, Oxford, v. 61, n. 6, p. 1159-1173, 2005

WRIGHT, G. D.; Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Adv. Drug Delivery Rev.** v. 57, p.1451-1470, 2005.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, March, 2007.

YAN, F., POLK, D.B. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 20, p. 565-571, 2004.

YANG, C. M.; LIN, C. H.; HUANG, Y. T.; HSU, C. T.; LIOU, M. L. Characterization of antimicrobial resistance patterns na integron in human fecal *Escherichia coli* in Taiwan. *Japanese Journal of Infectious disease*, v. 62, n.3, p. 177-181, 2009.

YU, H.; LUSCOMBE, N.M.; LU, H.X.; XIA, Y.; HAN, J.D.; BERTIN, N.; CHUNG, S.; VIDAL, M.; GERSTEIN, M. Annotation transfer between genomes: protein–protein interologs and protein–DNA regulogs. **Genome Res**, 14,, 1107–1118, 2004.

ZARCHI, A. A. K.; VATANI, H. A Survey on Species and Prevalence Rate of Bacterial Agents Isolated from Cockroaches in Three Hospitals. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**. v. 9, n 2, p. 197-200, 2009.

