

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO

DANIELY YUKIMI YAMADA MEDEIROS ALVES

COMPARAÇÃO FENOTÍPICA DA PRODUÇÃO DE ESBL EM CEPAS DE *Escherichia coli* UROPATOGÊNICAS E ISOLADAS DE CARNE DE FRANGO NA CIDADE DE
BAURU - SP

BAURU

2022

DANIELY YUKIMI YAMADA MEDEIROS ALVES

COMPARAÇÃO FENOTÍPICA DA PRODUÇÃO DE ESBL EM CEPAS DE *Escherichia coli* UROPATOGÊNICAS E ISOLADAS DE CARNE DE FRANGO NA CIDADE DE BAURU - SP

Monografia do projeto de pesquisa de Iniciação Científica do curso de Biomedicina apresentado à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação do Centro Universitário do Sagrado Coração.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Polano Vivan

BAURU

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

A474c

Alves, Daniely Yukimi Yamada Medeiros

Comparação fenotípica da produção de ESBL em cepas de *Escherichia coli* Uropatogênicas e isoladas de carne de frango na cidade de Bauru-SP / Daniely Yukimi Yamada Medeiros Alves. -- 2022.
25f. : il.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Carolina Polano Vivan

Monografia (Iniciação Científica em Biomedicina) - Centro
Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP

1. Carne de frango. 2. *Escherichia coli*. 3. ESBL. 4. Resistência bacteriana. 5. Infecções do trato urinário. I. Vivan, Ana Carolina Polano. II. Título.

Dedico este trabalho à minha mãe, Marina
Kazue Yamada, por todo amor e apoio que
sempre me deu.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me abençoar em todos os passos e à minha mãe, por sempre estar ao meu lado me dando todo o apoio necessário durante a realização desta pesquisa e por acreditar em meus sonhos.

Agradeço também a minha orientadora Profa Dra Ana Carolina Polano Vivan, por estar presente em todas as etapas de confecção desta pesquisa, desde tirar algumas dúvidas que tive no decorrer e durante a realização das práticas. Além disso, de todo o apoio, paciência e compreensão quando tive incertezas da minha capacidade de realizar tal projeto. Além de todo o conhecimento repassado a mim. Sou extremamente grata.

Ao Centro Universitário Sagrado Coração pela oportunidade de realizar a pesquisa e de fornecer os meios necessários para a concepção dela. Além disso, agradeço as meninas do laboratório, em especial a Fabiane, responsável pelo laboratório, por ter me ajudado quando precisava.

As minhas amigas, por terem me apoiado em tudo, me ajudando sempre que precisava, desde uma palavra de incentivo ou até mesmo me ouvindo desabafar. Vocês foram de extrema importância neste trajeto. Agradeço especialmente a Camilla Maitland por ter me ajudado com algumas dicas e principalmente com o meu resumo em inglês, serei eternamente grata.

RESUMO DA PESQUISA FINALIZADA

As infecções do trato urinário são causadas principalmente por bactérias relacionadas ao ambiente hospitalar e à comunidade, sendo a *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) mais comumente identificada. Estas bactérias podem apresentar mecanismos de resistência, dentre elas, ressaltam-se as enzimas betalactamases, como as β -lactamases de amplo espectro (ESBL), capazes de hidrolisar os anéis β -lactâmicos de antibióticos como cefalosporinas de primeira a quinta geração, aztreonam e penicilina, diminuindo as opções terapêuticas. O presente estudo teve como objetivos selecionar cepas de *Escherichia coli* em amostras de urina obtidas de um laboratório de análises clínicas e pesquisar enterobactérias em amostras de frango, comercializadas na cidade de Bauru-SP, identificando a possível produção da enzima ESBL, além de compará-las. Para tanto, foram selecionadas 20 amostras de *E. coli* de urocultura e 11 amostras de enterobactérias isoladas de frango, as quais foram criopreservadas em caldo BHI e glicerol na proporção 60:40. Em seguida foi realizado antibiograma para avaliar a sensibilidade a antimicrobianos, com base no método padrão de difusão de disco recomendado pelo BrCAST para enterobactérias e para a pesquisa fenotípica de produção de ESBL foi utilizado o método de disco aproximação do CLSI. No total foram analisadas 29 amostras, sendo *Escherichia coli* a principal bactéria identificada, seguida de *Klebsiella pneumoniae*. Dentre essas amostras, apenas 3 foram fenotipicamente positivas para a produção de ESBL, o que foi verificado por uma zona de achatamento do halo da amoxicilina/ácido clavulânico. Em conjunto foi possível analisar, em decorrência da disposição dos discos de antibióticos, a produção da enzima Amp C, identificada pelo achatamento de halo entre ceftazidima e imipenem e na cruz do teste fenotípico de ESBL. A partir destes resultados é possível comparar a incidência de *Escherichia coli* em amostras de frango e de urina e sua importância epidemiológica na cidade de Bauru.

Palavras-chave: Carne de frango; *Escherichia coli*; ESBL; Resistência bacteriana; Infecções do trato urinário.

ABSTRACT

Urinary tract infections are most commonly caused by nosocomial and community-acquired bacteria, that being said, uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) are the most dominant etiologic agents identified. Some UPEC strains can obtain resistance to antibiotics including the five generations of cephalosporins, since these microbes can utilize extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), which are enzymes capable of hydrolyzing β -lactam rings of antibiotics like aztreonam and penicillin, resulting in fewer therapeutic alternatives. The purpose of this study was to select strains of *Escherichia coli* from urine samples obtained from a laboratory, as well as to investigate enterobacteria in chicken samples commercialized in the city of Bauru, and possibly identify the production of ESBL enzymes. For this aim, 20 samples of *E. coli* from urine cultures and 11 samples of enterobacteria isolated from chicken were selected and cryopreserved in BHI broth and glycerol in a 60:40 ratio. Afterward, an antibiogram was performed to analyze antimicrobial sensitivity based on the standard method of disk diffusion guidelines by BrCAST for enterobacteria. Additionally, the CLSI approximation disk method was used for phenotypic research of ESBL production. A total of 29 samples were analyzed, and *Escherichia coli* was the main bacterium identified, followed by *Klebsiella pneumoniae*. Among these samples, only 3 were phenotypically positive for ESBL production, because the disk test showed flattening of the amoxicillin/clavulanic acid inhibition zone. Furthermore, it was possible to verify the production of Amp C enzymes since the inhibition zones between ceftazidime and imipenem were flattened and because of the cross on the Phenotypic ESBL test. These results make it possible to compare the incidence of *Escherichia coli* in chicken and urine samples as well as evaluate its epidemiological importance in Bauru.

Keywords: Chicken meat; *Escherichia coli*; ESBL; Bacterial resistance; Urinary tract infection.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	9
1.1	OBJETIVOS.....	11
1.1.1	Objetivo geral	11
1.1.2	Objetivos específicos	11
1.2	JUSTIFICATIVA	11
2	MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1	OBTENÇÃO DOS ISOLADOS E SELEÇÃO DAS CEPAS.....	12
2.2	TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	13
2.3	PESQUISA FENOTÍPICA DE PRODUÇÃO DE ESBL	13
3	RESULTADOS	15
4	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	20
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
	REFERÊNCIAS	23
	ANEXO I	26

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

As infecções do trato urinário (ITUs) apresentam alta prevalência mundial, afetando geralmente as mulheres, devido à própria anatomia feminina (DOCKRELL, *et al.*, 2015). Estas infecções podem ser graves e de extrema importância no ambiente hospitalar e na comunidade, direcionando muitos pacientes ao atendimento ambulatorial e até mesmo à terapia empírica. As ITUs são causadas por alguns patógenos, dentre eles o mais prevalente é a *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC), uma enterobactéria com mecanismos de virulência específicos e capazes de infectar o trato urinário humano (MANN *et al.*, 2017).

O uso de medicamentos contra infecções passou a ser possível apenas a partir da década de 1930 (DROPA, 2012). Contudo, o uso frequente de antimicrobianos como terapia empírica, pode ser uma das principais causas de seleção de bactérias resistentes. Um exemplo é o medicamento Cotrimoxazol que era usado para tratar ITUs, porém a resistência disseminada de *E. coli* sobre este medicamento, tornou difícil seu uso (LEE, 2018). Com isso, a resistência bacteriana tem sido uma das principais causas de infecções relacionadas a saúde (IRAS), sendo responsáveis pelo aumento disseminado do uso de antimicrobianos de amplo espectro. A resistência bacteriana surge naturalmente, por meio de mutações e recombinações genéticas sofridas pelos microrganismos e com isso podem estar correlacionados com a presença de bactérias multirresistentes na comunidade e infecções ambulatoriais (DROPA, 2012; PARTRIDGE *et al.*, 2018).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* se sobressaem pela sua multirresistência e alta morbidade (ZAGUI, 2019). Algumas espécies são frequentes em infecções específicas e recorrentes, como *Klebsiella pneumoniae*, em pneumonia hospitalar e *Escherichia coli* em infecções do trato urinário (MELO, 2014). Estas bactérias possuem diversos mecanismos de resistência contra antimicrobianos, dentre eles se destacam as enzimas hidrolisantes betalactamases, como as ESBL (β -lactamases de amplo espectro). Descrita pela primeira vez em 1983 na Alemanha, em isolados de *Klebsiella pneumoniae* e posteriormente disseminadas para *Escherichia coli*, estas enzimas são responsáveis por hidrolisar antibióticos betalactâmicos, como cefalosporinas e penicilinas, inativando-os ou diminuindo a sua ação (BARBOSA *et al.*, 1999/2000; RASMUSSEN; HOIBY, 2007; PATERSON, 2006). As ESBL hidrolisam dois grupos de beta lactâmicos, os de espectro estreito como penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração, e os de amplo espectro como aztreonam e cefalosporinas de terceira, quarta e quinta gerações. Sua codificação ocorre por meio de genes

plasmidiais, que são facilmente transferidos a outros microrganismos através da conjugação. (BARBOSA *et al.*, 1999/2000; BRAOIOS, 2009; DROPA, 2012; EL JADE *et al.*, 2016; ZAGUI, 2019). A presença dessa enzima em ambientes hospitalares e sua atuação na resistência ao tratamento com antibióticos, tem se mostrado um problema em pacientes hospitalizados, ocasionando um aumento na morbidade e mortalidade por infecções bacterianas (LAGO, 2010; OLIVEIRA, 2009; SONCINI, 2021). As cepas produtoras de ESBL podem apresentar sensibilidade à ação de inibidores de beta-lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam quando testadas *in vitro*, sendo possível sua detecção por métodos fenotípicos (BRAOIOS, 2009; WILLIAMS, 1997).

Algumas pesquisas recentes indicam que animais de produção alimentícia, como frango, podem ser um potencial fonte de resistência antimicrobiana para *E. coli* em humanos. Um fator contribuinte para o aumento de infecções por este patógeno, é o uso indiscriminado de penicilina e cefalosporinas nesses animais, como terapia ou em aditivos para ração, sendo largamente transmitido no meio zoonótico (KOGA *et al.*, 2015; LAZARUS *et al.*, 2015). Além disso, genes de virulência também foram encontrados em cepas de *E. coli* isoladas de carcaças de frango, como hlyF, iss, ompT, iron e iutA. Alguns estudos caracterizaram e classificaram mais de 350 tipos de ESBL, as quais sofreram mutações genéticas de beta-lactamases clássicas (TEM-1, TEM-2 e SHV-1), surgindo famílias de ESBL do tipo TEM e SHV. Além disso, a família das de CTX-M é amplamente encontrada em cepas de *E. coli* (OLIVEIRA, 2009; SEENAMA; THAMLIKITKUL; RATTHAWONGJIRAKUL, 2019). O grupo das CTX-M 2 apresentam maior frequência e são encontradas em diversas enterobactérias (SAMPAIO; GALES, 2016). Essas enzimas isoladas de carne de frango tiveram sua disseminação alavancada pelo aumento das importações brasileiras do alimento, visto que a transmissão pode ocorrer por meio da ingestão de carne contaminada. Esta contaminação por *E. coli* pode acontecer por meio do abate mal feito e por vias intermediárias, como meio ambiente (águas superficiais e solo), nas quais os genes de resistência são transferidos a outras bactérias de forma horizontal (conjugação, transdução e transformação) (CAMPELO, 2018; DROPA, 2012; LAZARUS, 2014; WARREN *et al.*, 2008; ZAGUI, 2019). Outra enzima encontrada em frango pertence ao grupo CTX-M-44, sendo relatada em grande escala no Brasil, mas que já havia sido detectada desde 1996 no Japão (HIROI *et al.*, 2012; IARK *et al.*, 2018; ISHI *et al.*, 1995).

Estudos são necessários para acompanhar a realidade de ambientes hospitalares e comunitários. Frente à possível transmissão de cepas e genes de resistência entre as bactérias de importância clínica e animal, faz-se necessária a implantação de medidas de contenção e controle, para minimizar a troca desses genes entre os ambientes supracitados. Além disso, para

detecção de mecanismos de resistência realiza-se métodos tradicionais fenotípicos que ajudam na análise epidemiológica (BRAOIOS, 2009; WILLIAMS, 1997).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo comparar cepas de *E.coli* isoladas de amostras de urina (ambulatoriais e hospitalares) com cepas da mesma espécie ou família em amostras de frango comercializadas na cidade de Bauru-SP, estabelecendo uma correlação entre estas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Estocar cepas de *E.coli* isoladas de urina do Laboratório Integrado, com qualquer perfil de sensibilidade;
- Processar amostras de frango comercializadas na cidade de Bauru-SP, em busca de presença de cepas de *E.coli* ou outras enterobactérias e estocar estas;
- Realizar antibiograma por disco difusão em todas as cepas isoladas (humana e animal) e avaliar o perfil de sensibilidade seguindo o protocolo do BRCast (2018);
- Investigação do fenótipo de produção de ESBL pelo método de disco aproximação.

1.2 JUSTIFICATIVA

Algumas bactérias multirresistentes, como é o caso das produtoras de enzimas betalactamases de amplo espectro (ESBL), estão presentes tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade. Muitos estudos recentes, inclusive, têm demonstrado que criação de animais destinados ao consumo humano têm servido de reservatório para algumas destas enzimas. Sendo assim, este trabalho vem de encontro à necessidade de se investigar o perfil de resistência de cepas de importância animal. Considerando-se este um tema de saúde pública geral, a comprovação de similaridade entre o perfil das cepas de animais e de importância clínica pode estimular maior conscientização acerca do uso racional de medicamentos. Além disso, pode ser discutida uma alteração no protocolo de tratamento das infecções comunitárias.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS E SELEÇÃO DAS CEPAS

Os isolados clínicos de *E. coli* foram recuperados de amostras de urina destinadas a descarte, fornecidas pelo laboratório Integrado, que envia material para o laboratório de Biologia do UNISAGRADO.

O laboratório forneceu, no período de 29 de outubro a 25 de novembro de 2021, 30 amostras de antibiograma. Dessas, 6 amostras eram repetidas, totalizando, no fim, 24 amostras recebidas (Tabela 1). Foram selecionadas e estocadas apenas as amostras de *E. coli*.

Tabela 1 - Amostras recebidas do laboratório Integrado.

Amostras	Número de isolados
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Enterococcus</i> spp.	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
ESBL +*	1

Fonte: Elaborado pela autora.

*amostra sem identificação de espécie, apenas com a indicação de teste fenotípico positivo para ESBL, portanto não selecionada para estoque neste trabalho.

A carne de frango foi obtida comercialmente de um supermercado da região, o qual era responsável por seu manuseio e venda. As carnes refrigeradas foram processadas no laboratório de Biologia. A metodologia empregada seguiu os protocolos realizados por Campelo *et al.* (2018), com algumas modificações. Os pedaços comprados foram o peito e sobrecoxa desossada, com unidade analítica de aproximadamente 100 a 200 g por experimento, com intuito de aumentar a superfície de contato. Cada pedaço de frango foi processado individualmente, correspondendo a 3 amostras de peito e 2 de sobrecoxa desossada. Cada amostra foi cortada em pedaços menores e inserida em um saco estéril contendo 200 mL de caldo BHI (*Brain heart infusion* – Caldo cérebro coração). Esse processo aconteceu em câmara de fluxo laminar, para evitar contaminação externa. Posteriormente, cada saquinho foi homogeneizado em equipamento do tipo Stomacher, disponível no laboratório, por 2 minutos, e ficou em estufa a 35 +/-2°C overnight. A seguir, 50 µL do caldo foi inoculado em ágar MacConkey (meio seletivo para bactérias Gram negativas), e semeado em superfície com

auxílio de uma alça de Drigalski. Passado este período, diferentes colônias foram “pescadas” e reisoladas em ágar MacConkey, para obtenção de crescimento de colônias puras. Estas foram identificadas por meio de provas bioquímicas para enterobactérias EPM/MILi/Citrato. O EPM é responsável por testar fermentação e produção de gás através da glicose, produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), hidrólise da ureia e desaminação de triptofano. O MILi avalia a motilidade, indol e descarboxilação de lisina e o citrato avalia as espécies que usam do citrato como fonte de carbono. Em seguida, as bactérias identificadas foram estocadas em microtubos contendo caldo BHI e glicerol na proporção 60:40, sendo criopreservadas no laboratório de Biologia, para posterior avaliação. As amostras de urina foram nomeadas com a letra U, seguida da numeração (1, 2, 3...), já para as amostras de frango foi usada a letra F seguida de sua numeração (1, 2, 3...).

2.2 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

As bactérias estocadas foram reativadas em ágar MacConkey, para confirmação da pureza da cultura. Em seguida foram identificadas por meio das provas bioquímicas EMP/MILi/Citrato. As bactérias foram capturadas das placas de MacConkey e inoculadas em salina estéril, seguindo a escala 0,5 de Mc Farland. Estes inóculos foram semeados, com auxílio de swab estéril, no ágar Mueller-Hinton. O antibiograma foi realizado de acordo com o método padrão de difusão de disco recomendado pelo BrCAST (Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos) para enterobactérias, sendo os antibióticos usados: amicacina (AMI), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC), aztreonam (ATM), cefepime (COM), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO), ciprofloxacina (CIP), imipenem (IPM), meropenem (MER), nitrofurantóina (NIT), piperaciclina/tazobactam (PIT) e sulfazotrim (SUT). Em seguida foram selecionados os isolados que apresentaram resistência a cefalosporinas de terceira e/ou quarta geração. As cepas que não apresentaram tal perfil foram excluídas do próximo passo.

2.3 PESQUISA FENOTÍPICA DE PRODUÇÃO DE ESBL

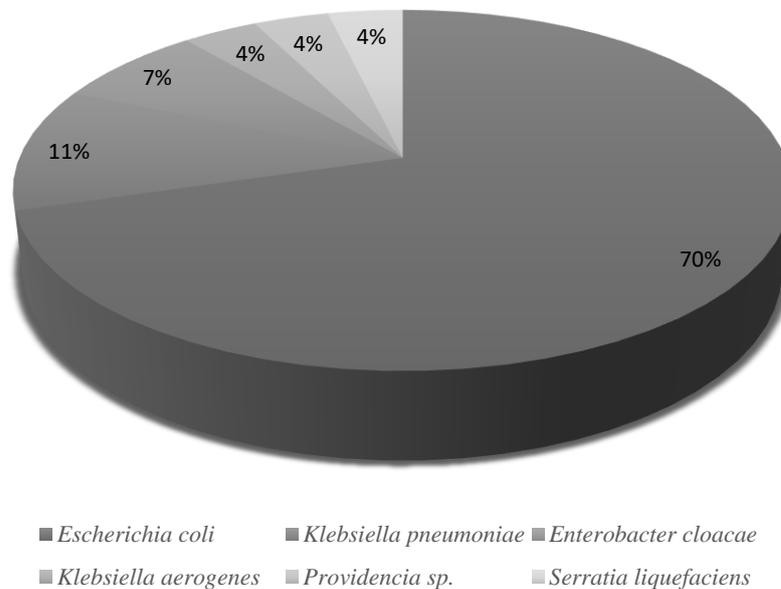
Foi empregada uma metodologia de disco aproximação, descrita pelo documento M100-S18 do CLSI, para a avaliação do fenótipo de produção de ESBL. Este método corresponde ao teste alternativo (duplo disco sinergismo), onde discos contendo cefepime, ceftazidima, amoxicilina+ácido clavulânico, aztreonam e cefotaxima ficaram dispostos a 30 mm de distância uns dos outros, formando uma cruz. O aparecimento de uma zona fantasma ou distorção do

halo das cefalosporinas são indicativos da produção das enzimas ESBL. Não foi possível realizar o método confirmatório ou disco combinado, devido à dificuldade em obter os discos compostos.

3 RESULTADOS

Foram analisadas 31 amostras estocadas, obtidas tanto de frango quanto de urina recebida do laboratório Integrado. Dessas, apenas 29 apresentaram crescimento quando foram semeadas em ágar MacConkey, para sua reativação. Das amostras que não cresceram, 2 eram de frango (F01 e F02) e 1 de urina (U15).

Gráfico 1 - Espécies identificadas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Quanto à pesquisa fenotípica, apenas 3 cepas apresentaram positividade para ESBL por meio do teste de disco aproximação. Tal positividade foi verificada por meio de uma zona de achatamento do halo da amoxicilina/ácido clavulânico. Dentre os isolados que apresentaram produção desta enzima, se encontram, principalmente, *Escherichia coli*, isoladas de amostras de urina (U09 e U12) e *Providencia sp.*, isolada de amostra de frango (F10).

No momento da preparação dos antibiogramas, os discos de antibióticos foram dispostos de forma aleatória. Com isso, foi possível visualizar um achatamento de halo entre os antibióticos ceftazidima e imipenem, além do achatamento na cruz do teste fenotípico de ESBL, sendo característicos da produção da enzima Amp C. Ao total, 7 isolados apresentaram a produção de Amp C (F03, F05, F06, F07, F10, F11 e U16), sendo uma cepa de amostra de urina (*E. coli*) e as demais de amostra de frango, com variadas bactérias, sendo elas *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella aerogenes*, *Providencia sp.* e *Serratia*

liquefaciens. Além disso, pôde-se observar, que apenas a cepa de urina não apresentou achatamento na cruz fenotípica.

Quadro 1 - Cepas positivas para ESBL.

Cepas	Espécies
F10	<i>Providencia sp.</i>
U09	<i>Escherichia coli</i>
U12	<i>Escherichia coli</i>

Fonte: Elaborado pela autora.

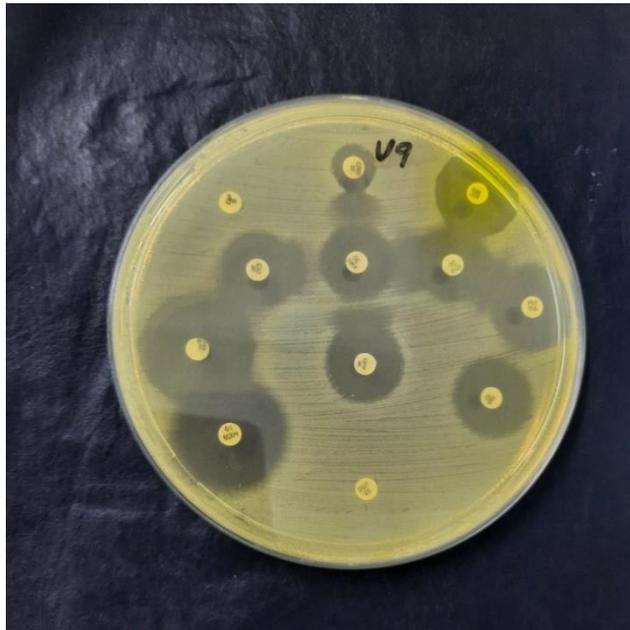
Quadro 2 - Cepas positivas para Amp C.

Cepas	Espécie	Achatamento de halo CAZ/IPM	Achatamento na cruz de ESBL
F03	<i>Enterobacter cloacae</i>	Positivo	Positivo
F05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo	Positivo
F06	<i>Enterobacter cloacae</i>	Positivo	Positivo
F07	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Positivo	Positivo
F10	<i>Providencia sp.</i>	Positivo	Positivo
F11	<i>Serratia liquefaciens</i>	Positivo	Positivo
U16	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	Negativo

Fonte: Elaborado pela autora.

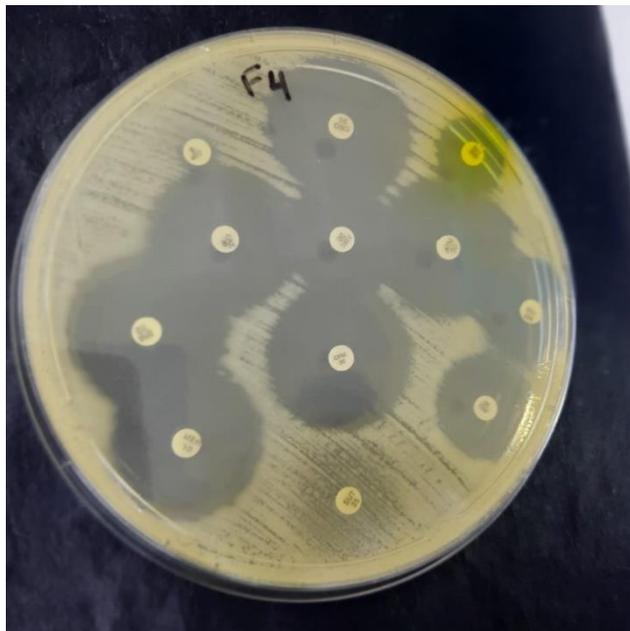
Na figura 1, é possível verificar um teste fenotípico de ESBL positivo, pela formação da zona de achatamento do halo da amoxicilina e ácido clavulânico, diferentemente da figura 2, que representa um teste negativo. Já na figura 3, é possível visualizar uma placa com positividade de AmpC, evidenciada pelo achatamento dos halos entre ceftazidima e imipenem.

Figura 1 - Teste de ESBL positivo.



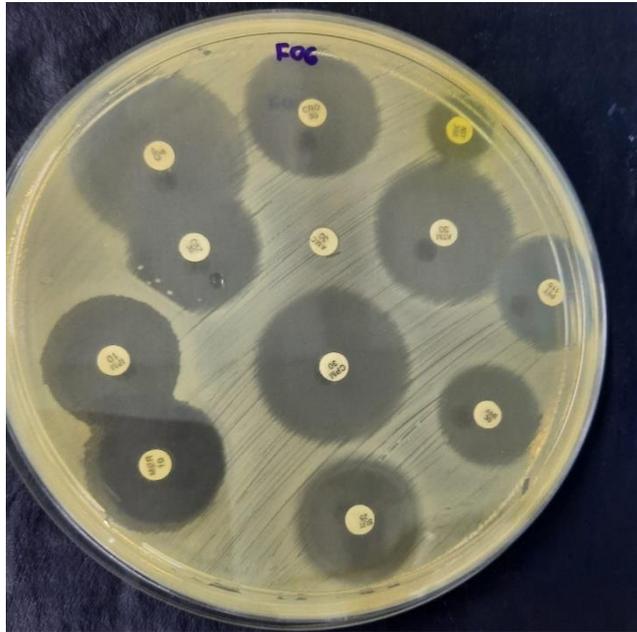
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 2 - Teste de ESBL negativo.



Fonte: Elaborado pela autora.

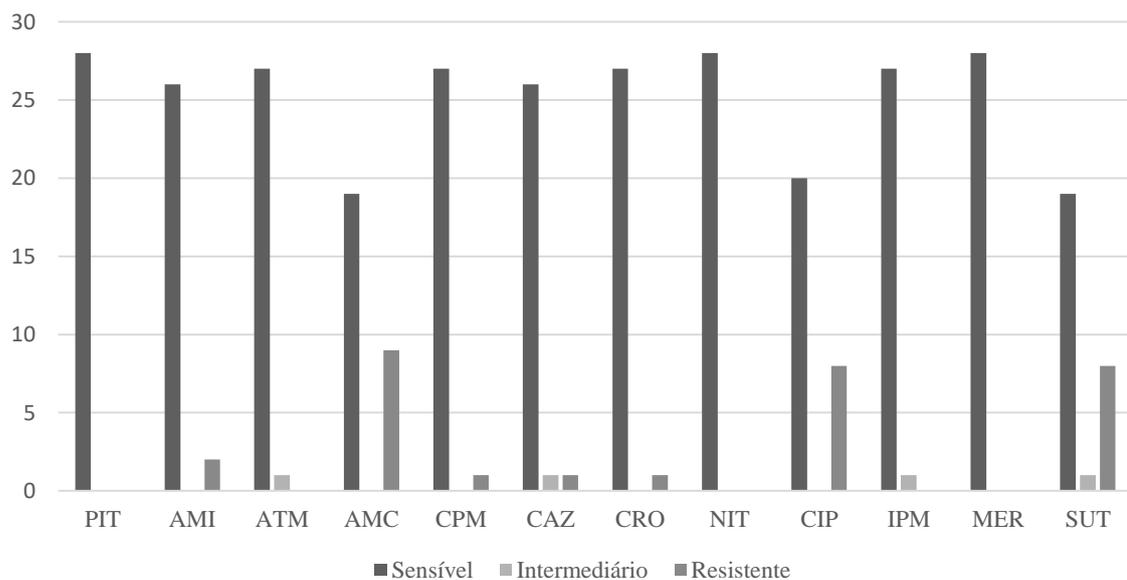
Figura 3 - Placa com AmpC positivo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação à sensibilidade aos antimicrobianos, pôde-se observar que a maioria das bactérias são sensíveis a quase todos os antibióticos testados. Além disso, mais da metade das cepas apresentaram resistência a alguns dos antibióticos, sendo os mais afetados o sulfazotrim e a amoxicilina/ácido clavulânico, como apresentado no gráfico 2.

Gráfico 2 - Determinação do teste de sensibilidade aos antimicrobianos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Foi possível observar, também, que em alguns antibiogramas, houve a formação de mais de um halo no antibiótico sulfazotrim, como demonstrado na figura 4. Tal ocorrência é devido à sua interação com substâncias antagonistas presentes no ágar Mueller Hinton, assim, a zona de inibição vai diminuindo até atingir uma inibição total.

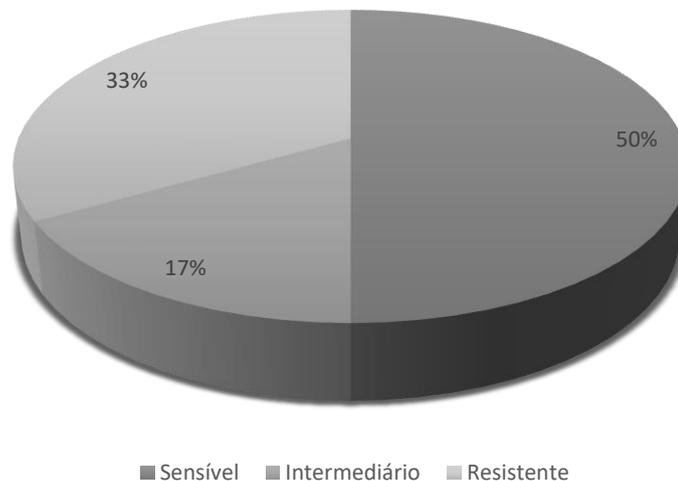
Figura 4 - Halos no Sulfazotrim.



Fonte: Elaborado pela autora.

A cepa que apresentou um teste mais variado foi a U09 (*Escherichia coli*), a qual era resistente para cefepime, ceftriaxona, ciprofloxacina e sulfazotrim e intermediário para aztreonam e ceftazidima. No gráfico 4 é possível observar que a cepa em questão, apresenta mais resistência aos antibióticos testados.

Gráfico 3 - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos da cepa U09.



Fonte: Elaborado pela autora.

4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os mecanismos de resistência são uma estratégia importante para as bactérias se protegerem e sobreviverem à ação dos antimicrobianos. A produção da enzima ESBL é a principal forma de resistência encontrada nas enterobactérias, principalmente em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, em ambientes hospitalares, causando as infecções relacionadas à saúde (IRAS). Uma vez que ela possui a capacidade de hidrolisar algumas classes de antibióticos, é de suma importância realizar a sua detecção, seja por testes fenotípicos e genotípicos, para tentar conter a disseminação de bactérias multirresistentes. (FARIAS *et al.*, 2022).

Os genes responsáveis por codificar a enzima ESBL são facilmente disseminados no meio zoonótico, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos na criação de animais destinados ao consumo humano, isto é, é possível identificar cepas de *E. coli* produtoras desta enzima em larga escala nesses animais. (FARIAS *et al.*, 2022).

Diversas bactérias possuem a capacidade de produzir naturalmente a enzima Amp C, sendo geralmente da família Enterobacteriaceae, tais como, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Providencia* spp., *Yersinia* spp. e *Shigella* spp. Este estudo apenas comprovou que as bactérias *E. coli*, *Enterobacter* spp. e *Providencia* spp. possuem a capacidade de produzir esta enzima, tendo em vista que foram as cepas que apresentaram positividade, juntamente com *Serratia liquefaciens* e *Klebsiella* spp.. Estes microrganismos apresentam um gene cromossomal induzível, que quando exposto a agentes indutores (imipenem, cefepime, ácido clavulânico e ampicilina) é expresso e assim, a bactéria passa a produzir Amp C, ocasionando na resistência aos beta-lactâmicos e suscetibilidade às cefalosporinas de terceira e quarta geração. (SANTIAGO *et al.*, 2016). Segundo um estudo de Koga *et al.* (2019) todas as cepas analisadas, de carne de frango e de urina, apresentaram o gene *bla_{CM-2}*, que é o mais comum encontrado em Amp C.

Através do estudo de Dantas (2011), observou-se que dentre os isolados estudados, 58% de *Klebsiella pneumoniae* e 32% de *Escherichia coli* apresentaram positividade para produção de ESBL. Ainda neste estudo, das enterobactérias recuperadas (n=132), 104 (74,3%) foram identificadas como *K. pneumoniae*, *E. coli* e *Enterobacter* spp., apresentando em conjunto um índice de produção de Amp C em 8,6% das cepas analisadas. E, outro estudo, Souza *et al.* (2021), de 79,4% (n=781) enterobactérias identificadas, apenas 4,5% (n=35) foram positivas para produção de ESBL.

Por meio deste estudo para determinação fenotípica de ESBL, foi possível analisar que as cepas que mais apresentaram positividade na produção da enzima foram as de urina, sendo identificadas como *Escherichia coli*. Contudo, a cepa de frango F09, *Providencia* sp. também apresentou fenótipo positivo para ESBL, os quais foram identificados pela presença de uma zona fantasma entre os antimicrobianos da cruz fenotípica. A partir disso, pode-se analisar que as bactérias multirresistentes ainda se encontram largamente disseminadas entre o ambiente hospitalar, porém a presença de ESBL nas amostras de frango é um fato, como outros estudos já relataram, decorrente do uso indiscriminado de antimicrobianos em animais e da fácil disseminação dos genes. Sendo assim, a identificação da enzima em animais, é alarmante, tendo em vista que, a transferência horizontal de mecanismos de resistência ocorre facilmente com a microbiota de seres humanos, sendo passível de causar infecções sem terapias efetivas. Além disso, a identificação de Amp C é importante no tratamento eficaz, tendo em vista, que uma bactéria produtora desta enzima, pode ser sensível a alguns antimicrobianos em no teste in vitro, mas apresentar resistência em teste in vivo. (SANTIAGO *et al.*, 2016).

A taxa de resultados obtidos foi um pouco escassa, devido ao uso de apenas uma metodologia para analisar a produção de ESBL, levando em consideração a dificuldade em se adquirir a outra metodologia proposta. Além disso, a pouca quantidade de amostras obtidas e a identificação de poucas *E. coli* podem ter contribuído para a dificuldade em avaliar a correlação entre cepas clínicas e animais. Contudo, o estudo teve um resultado viável de análise, sendo possível compreender a necessidade de se estudar os mecanismos de resistência e controlar o uso de antimicrobianos em animais destinados ao consumo, além de seu uso correto.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A detecção de bactérias multirresistentes e seus mecanismos de defesa se faz necessária para combater a sua disseminação em ambientes hospitalares e em animais criados para o consumo humano. É importante entender a necessidade de realizar testes diversificados e multidisciplinares, com uma quantidade significativa de amostras, para se ter a real comprovação de resistência, além de poder fazer uma melhor comparação.

A investigação de mecanismos de resistência em animais de produção deve seguir sendo estudada e correlacionada com as infecções humanas. Pelo uso dos antimicrobianos serem necessários para tratamento de infecções ou mesmo profilaxia, é preciso que o emprego desses compostos seja analisado e regulado por meio de estudos epidemiológicos constantes, para assim, diminuir a disseminação de microrganismos multirresistentes em infecções hospitalares e comunitárias.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, R C. *et al.* E. Beta-lactamase de espectro estendido: prevalência e comparação de métodos de *screening*. Semina: **Cio Biol. Saúde, Londrina**. V. 20/21, n. 2, p.17-24, jun. 1999/2000.
- BRAOIOS, A. **Incidência de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) em um hospital universitário**. Colloquium Vitae. ISSN: 1984-6436, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 109–116, 2010. Disponível em: <http://journal.unoeste.br/index.php/cv/article/view/174>. Acesso em: 09 mar. 2021.
- DANTAS, Raquel Cristina Cavalcanti. **Bacteremia Hospitalar por bacilos Gram-negativos multirresistentes: Fatores de risco e detecção de ESBL, AmpC e metalo- β -lactamase**. 2011. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/16663>. Acesso em: 15 ago. 2022.
- DOCKRELL, H. M. *et al.* **Microbiologia Médica**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- DROPA, Milena. **Disseminação da resistência a antimicrobianos em cepas clínicas e ambientais de Enterobacteriaceae: identificação e mapeamento do ambiente genético de genes codificadores de ESBL**. 2013. Tese (Doutorado em Serviços de Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, University of São Paulo, São Paulo, 2013.
- EL-JADE, M. R. *et al.* **ESBL Detection: Comparison of a Commercially Available Chromogenic Test for Third Generation Cephalosporine Resistance and Automated Susceptibility Testing in Enterobacteriaceae**. **PLoS ONE**. V. 11(8), 2016.
- FARIAS, D. V. *et al.* Investigação da resistência aos betalactâmicos e da produção de betalactamase de espectro estendido (ESBL) em isolados de *Escherichia coli* uropatogênicas ciprofloxacina-resistente. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**. V. 4, n.1, p. 13-26, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.29327/226760.4.1-2>. Acesso em: 10 ago. 2022.
- HIROI, M. *et al.* **Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals**. **J Vet Med Sci**. V. 74: p. 189-195, 2012.
- IARK, A. *et al.* **First report of CTX-M-44 in *Escherichia coli* isolated from chicken meat produced in Brazil**. **The Journal of Infection in Developing Countries**. V. 12, n. 04, p. 284-285, 30 Apr. 2018.
- ISHII, Y. *et al.* **Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli***. **Antimicrob Agents Chemother**. V. 39: p. 2269–2275, 1995.
- KOGA V. L. *et al.* **Characterization of CMY-2-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses and human infection in a city of South Brazil**. **BMC Microbiol**. 2019. 19:174. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31362706/>. Acesso em: 13 jul. 2022.

KOGA, V. L. *et al.* Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná. **Brazil Foodborne Pathog Dis.** V. 12(6): p. 479–85, 2015.

LAGO, A., FUENTEFRIA, S. R., FUENTEFRIA, D. B. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** V. 43(4), 430–434. 2010.

LAZARUS B. *et al.* Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. **Clin Infect Dis.** V. 60(3):439–52, 2015.

LEE, Dong Sup *et al.* Community-Acquired Urinary Tract Infection by *Escherichia coli* in the Era of Antibiotic Resistance.” **BioMed research international.** V. 7656752. 2018.

MANN, R. *et al.* Metabolic Adaptations of Uropathogenic *E. coli* in the Urinary Tract. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.** V. 7, p. 241, 2017.

MELO, Luana Claudino de. **Microbiota comensal de animais de companhia como reservatório de genes codificadores de b-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e resistência a quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR).** 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, University of São Paulo, São Paulo, 2014.

OLIVEIRA, C. F. de Forno *et al.* Prevalência das famílias TEM, SHV e 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. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** V. 42(5), 556–560, 2009.

PARTRIDGE, S. R. *et al.* Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. **Clin Microbiol Rev.** V. 31(4), 2018.

PATERSON, D. L. Resistance in Gram-negative Bacteria: Enterobacteriaceae. **Am J Med.** V. 119, p. 20-28, 2006.

RASMUSSEN, J. W.; HOIBY, N. Class A carbapenemases. **J Antimicrob Chemother.** V. 60, p. 470-482, 2007.

SAMPAIO JL, GALES AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Braz J Microbiol.** V. 47 Suppl 1(Suppl 1): p.31–37, 2016.
SANTIAGO, G. S.; da MOTTA, C. C.; BRONZATO, G. F.; GONÇALVES, D.; de SOUZA, M. M. S.; COELHO, I. da S.; FERREIRA, H. N.; COELHO, S. de M. de O. A Review: AmpC β -lactamase production in Enterobacteriaceae. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine.** V. 38(Supl. 3), 17–30. 2016. Disponível em: <https://rbmv.org/BJVM/article/view/876>. Acesso em: 03 jul. 2022.

SEENAMA C, THAMLIKITKUL V, RATTHAWONGJIRAKUL P. Multilocus sequence typing and bla_{ESBL} characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy humans and swine in Northern Thailand. **Infect Drug Resist.** 2019. V. 12:p. 2201–2214, 2019.

SONCINI, João Gabriel Material. **Monitoramento da resistência aos antimicrobianos em uropatógenos da comunidade e sua relação com determinantes de resistência presentes em bactérias de origem animal.** Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. 2021. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?code=vtls000234130>. Acesso em: 11 ago. 2022.

SOUZA, G. A. A. D. *et al.* *ESBL producing enterobacteria isolated from outpatients urocultures.* **Research, Society and Development.** [S. l.]. v. 10, n. 6, p. e37410615701, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i6.15701. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/15701>. Acesso em: 19 ago. 2022.

WARREN, R. E. *et al.* *Imported chicken meat as a potential source of quinoloneresistant Escherichia coli producing extended-spectrum b-lactamases in the UK.* **J Antimicrob Chemother.** V. 61: p. 504–508, 2008.

WILLIAMS, J. D. *β -lactamase inhibition and in vitro activity of sulbactam and sulbactam/cefoperazone.* **Clin Infect Dis.** V. 24, p.494-497, 1997.

ZAGUI, Guilherme Sgobbi. **Avaliação da multirresistência a antibióticos e produção de ESBL e carbapenemases em bacilos gram-negativos de efluente hospitalar e urbano.** 2019. Dissertação (Mestrado em Enfermagem em Saúde Pública) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

ANEXO I**CARTA DE DISPENSA DE APRESENTAÇÃO AO CEP OU CEUA**

À

**COORDENADORIA DO PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA
UNISAGRADO**

Informo que não é necessária a submissão do projeto de pesquisa intitulado COMPARAÇÃO FENOTÍPICA DA PRODUÇÃO DE ESBL EM CEPAS DE *Escherichia coli* UROPATOGÊNICAS E ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO NA CIDADE DE BAURU - SP, ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) ou à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) devido às amostras recebidas pelos envolvidos neste projeto serem as placas de cultura destinadas a descarte, portanto nenhum dado de paciente será exposto no trabalho.

Atenciosamente,



Ana Carolina Polano Vivan

Bauru, 1 de abril de 2021.