

## CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR *Escherichia coli* patogênica extraintestinal (EXPEC) EM CÃES

Isadora Maria Soares de Melo<sup>1\*</sup>, Brendhal Almeida Silva<sup>2</sup>, Victor Santos do Amarante<sup>2</sup>, Salene Angelini Colombo<sup>2</sup>, Amanda Nadia Diniz<sup>2</sup>, Rafael Gariglio Clark Xavier<sup>2</sup> e Rodrigo Otávio Silveira Silva<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Discente no Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil – \*Contato: isamelo2740@gmail.com

<sup>2</sup>Discente no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

<sup>3</sup>Docente do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

### INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa encontrada na microbiota de diversas espécies domésticas e silvestres<sup>1,2</sup>. É um microrganismo oportunista e sua patogenicidade depende da presença de fatores de virulência<sup>3,4</sup>. As estirpes capazes de provocar infecções entéricas são chamadas de *E. coli* diarréogênicas (DEC), enquanto aquelas capazes de causar infecções fora do trato intestinal são denominadas *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC)<sup>2,4</sup>. As infecções extraintestinais podem ocorrer em vários sítios, acometendo, principalmente, o trato urinário e o sistema genital, além de ser comumente associadas a otites e meningites<sup>1,4,5,6</sup>.

O aparecimento de cepas multirresistentes de *E. coli* tem se tornado uma preocupação global<sup>5,7,8,9</sup>. Um fator importante capaz de ocasionar a resistência dos microrganismos é o uso indiscriminado de antimicrobianos, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária<sup>5,6,7,8,9</sup>. Os β-lactâmicos são antimicrobianos amplamente utilizados para tratar infecções na medicina humana e veterinária, devido ao seu amplo espectro de ação e à sua toxicidade seletiva<sup>10,11</sup>. Diante disso, algumas bactérias se tornam resistentes a esses medicamentos, produzindo enzimas capazes de inativá-los, como β-lactamases de espectro estendido (ESBL) e AmpC<sup>9,10</sup>. No contexto das infecções por *E. coli*, a resistência antimicrobiana tem-se tornado um desafio cada vez maior, dificultando o tratamento sobretudo de animais com quadros de graves e em sítios extraintestinais. Apesar dessa crescente importância, são raros os estudos avaliando a dinâmica desses quadros infecciosos, assim como inexistem trabalhos no Brasil caracterizando isolados de ExPEC de cães. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar os fatores de virulência e grupos filogenéticos de ExPEC isoladas de cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMG, bem como avaliar sua suscetibilidade antimicrobiana.

### METODOLOGIA

Foram utilizados 50 isolados de *Escherichia coli*, obtidos a partir de amostras clínicas extraintestinais de 50 cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFMG). Por meio das fichas de atendimento, foram coletadas informações sobre os animais. Todos os procedimentos realizados foram aprovados previamente pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG sob o protocolo nº 51/2015. Os isolados foram repicados em placas de ágar Mueller Hinton (Oxoid, Reino Unido) suplementado com 5% de sangue ovino desfibrinado e ágar MacConkey (MC) (Difco, USA), posteriormente incubados a 37°C por 24 horas. Três colônias com aspecto semelhante a *E. coli* foram submetidas a extração de DNA pelo método da guanidina<sup>12</sup>. Para que a identidade fosse confirmada, foi realizada a PCR com a amplificação do gene espécie-específico *gadA/B*<sup>13</sup>. Após a confirmação da identidade, as cepas foram caracterizadas filogeneticamente nos grupos A, B1, B2, C, D, E, F ou clado I, de acordo com o protocolo de Clermont et al. (2013)<sup>14</sup>. Através de PCR, foi realizada a identificação dos principais fatores de virulência comuns aos patótipos ExPEC: fímbria tipo 1 (*fimH*), aerobactina (*iutA*), alfa-hemolisina (*hlyA*), fímbria tipo P (*papC* e *papG*), gene de sobrevivência ao soro (*traT*), região central da fímbria tipo 1 (*focG*), fator necrosante citotóxico-1 (*cnf1*), fímbria S (*sfaS*)<sup>15</sup> e proteína uropatogênica específica (*usp*)<sup>16</sup>. Os isolados que apresentavam dois ou mais genes relacionados aos fatores de virulência foram classificados como ExPEC, seguindo o que foi definido por Johnson; Russo (2005)<sup>17</sup>.

Os isolados foram submetidos a testes de sensibilidade antimicrobiana pelo método da disco-difusão. Foram utilizados amoxicilina/ácido-clavulânico (30 µg), ampicilina (10 µg), cefoxitina (30 µg), ceftiofur (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), doxiciclina (30 µg), enrofloxacin (5 µg), gentamicina (10 µg), imipinem (30 µg), meropenem (30 µg), neomicina (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), oxitetraciclina (30 µg) e sulfametoxazol/trimetopim (25 µg) (Oxoid, Reino Unido). Os resultados dos testes de suscetibilidade foram interpretados de acordo com as diretrizes do CLSI para patógenos veterinários (CLSI, 2021), sendo

considerados multirresistentes (MDR) aqueles que apresentassem resistência a três ou mais classes de antimicrobianos.

Os isolados que apresentaram sensibilidade reduzida ao ceftiofur (halo < 16mm) foram submetidas à pesquisa de ESBL, através Etest de ceftazidima e ácido clavulânico (TZ/TZL), sendo consideradas positivas aquelas que apresentaram uma redução de oito vezes na CIM de ceftazidima/ácido clavulânico em comparação com a CIM da ceftazidima isolada (razão maior ou igual a 8). As amostras resistentes a cefoxitina foram submetidas à pesquisa de AmpC pelo teste de sinergia de disco duplo de cefoxitina-cloxacilina (CC-DDS), sendo consideradas positivas aquelas que apresentaram diferença ≥ 4 mm no diâmetro no disco de cefoxitina quando comparado com o disco de cefoxitina + cloxacilina.

Isolados de *E. coli* positivas para ESBL foram submetidas ao sequenciamento do genoma completo. O DNA genômico foi extraído usando o Maxwell 16® Research Instrument (Promega, EUA) e o sequenciamento do genoma foi realizado usando a plataforma Illumina NextSeq. A qualidade dos dados brutos foi analisada usando FastQC (Babraham Bioinformatics) e a montagem foi realizada usando SPAdes 3.5.0. ResFinder 4.1 foi utilizado para identificar determinantes de resistência antimicrobiana adquirida. Para avaliar a possível clonalidade dos isolados, os genomas de *E. coli* foram submetidos à análise de SNP usando CSIPhylogeny [114] usando *E. coli* K12 (MG1655) como referência.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

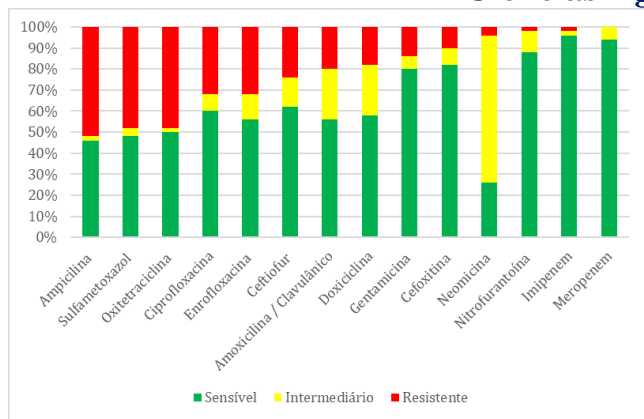
Dos 50 isolados obtidos, 54% (27/50) foram provenientes de fêmeas e 46% (23/50) de machos. Esse estudo não encontrou associação entre idade, raça e sexo dos animais, o que já foi relatado pela literatura<sup>18</sup>. Em contrapartida, também é sugerido que fêmeas são mais predispostas a infecções urinárias devido a diferenças anatômicas<sup>5,19</sup>.

Todos os genes de virulência pesquisados foram encontrados no presente estudo. Os fatores de virulência associados a fímbrias foram mais comuns, incluindo *focG* (47/50 – 94%), *fimH* (45/50 – 90%). Esses genes estão ligados a adesão dos microrganismos e são considerados extremamente importantes para a colonização das ExPEC<sup>5,20</sup>. Ademais, o Fator Necrosante Citotóxico (*cnf1*) foi encontrado em 88% das cepas (44/50), sendo capaz de gerar uma citolisina associada a casos de enterite, septicemia e infecções urinárias<sup>1,3</sup>.

O filogruppo B2 é conhecido por sua grande patogenicidade e capacidade de colonizar diversos sítios, podendo acumular vários genes de resistência<sup>6,10</sup>. Esse grupo foi o mais frequente (p < 0,05), correspondendo a 66% (33/50) dos isolados. Essas cepas apresentaram baixo perfil de resistência antimicrobiana quando comparadas a outros grupos, o que também foi encontrado em outros estudos, ao contrário do que geralmente é relatado pela literatura<sup>5,6</sup>.

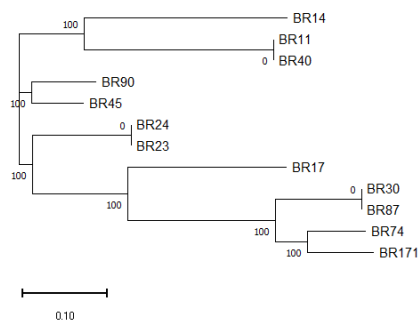
Metade das amostras utilizadas no estudo apresentaram multirresistência antimicrobiana, sendo a maioria delas proveniente de animais internados, incluindo casos de infecção nosocomial. Números significativos de resistência antimicrobiana foram observados para penicilinas, sulfonamidas e tetraciclina (Figura 1), seguindo o que foi relatado pela literatura<sup>5,6,9,18</sup>. Em treze amostras foi confirmada a presença de β-lactamases de espectro estendido e oito foram consideradas positivas para AmpC. Duas estirpes foram consideradas positivas tanto para ESBL quanto para AmpC. Essas duas enzimas são inibidoras dos beta-lactâmicos e representam um risco global, sobretudo quando encontradas em casos de infecções nosocomiais<sup>9,4,19</sup>. Esses resultados relacionados a resistência bacteriana podem ser explicados, principalmente, pela forte pressão seletiva sobre os microrganismos provocada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos<sup>5,6,7,8</sup>.

# X Colóquio Técnico Científico de Saúde Única, Ciências Agrárias e Meio Ambiente



**Figura 1:** Prevalência geral de resistência antimicrobiana entre isolados clínicos de *E. coli* (Fonte: autoral).

Apesar deste estudo não ter encontrado associação entre as infecções e as internações, metade das estirpes avaliadas foram obtidas de animais internados. Isso revela um dado importante para o controle da infecção, uma vez que a *E. coli* pode se tornar uma fonte de disseminação hospitalar com diversos mecanismos de resistência<sup>9,10</sup>. Ademais, por meio da realização da análise de SNPs, foram detectadas transmissões nosocomiais de três clones diferentes, confirmando a hipótese de disseminação desses patógenos.



**Figura 2:** Árvore filogenética de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) encontrados no genoma central e acessório de isolados de *E. coli* de cães com quadro de infecção extraintestinal pelo agente. A análise revela a transmissão de três clones, confirmando a infecção nosocomial nesses animais (Fonte: autoral).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O grande número de isolados com multirresistência reforça o desafio que infecções por ExPEC podem significar na rotina de pequenos animais, além da necessidade de constante reavaliação do uso de antimicrobianos em pequenos animais. Em adição, a confirmação da transmissão nosocomial de *E. coli* em três eventos reforça a necessidade de protocolos para mitigar o risco de infecção nosocomial em clínicas e hospitais veterinários.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. 1. Ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016.
- COURA, F.M. et al. Detection of virulence genes and the phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil. *Ciência Rural*, v. 48 (02), 2018.
- COURA, F.M.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. *Pesq. Vet. Bras*, v. 34 (9), 2014.

- PITOUT, J.D.D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, v. 3 (9), 2012.
- COURA, F.M. et al. Virulence Genes Profile and Antimicrobial Susceptibility of Community-Acquired Bacterial Urinary Tract Infections in a Brazilian Hospital. *Current Microbiology*, v. 78, p. 3913-3923, 2021.
- OSUGUI, L. et al. Virulence genotypes, antibiotic resistance and the phylogenetic background of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections of dogs and cats in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 171, p. 242-247, 2014.
- HUGHES, L.A. et al. Cross-sectional survey of antimicrobial prescribing patterns in UK small animal veterinary practice. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 104, p. 309-316, 2012.
- KARKABA, A. et al. Carriage and population genetics of extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in cats and dogs in New Zealand. *Veterinary Microbiology*, v. 233, p. 61-67, 2019.
- PENG, Z. et al. Antimicrobial resistance and population genomics of multidrug-resistant *Escherichia coli* in pig farms in mainland China. *Nature communications*, v.13 (1116), 2022.
- BORTOLAMI, A. et al. Diversity, Virulence, and Clinical Significance of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and *pAmpC*-Producing *Escherichia coli* From Companion Animals. *Frontiers in Microbiology*, v. 10 (1260), 2019.
- DE LIMA, A.L. et al. Análise da dispensação de antibióticos beta-lactâmicos após a RDC nº 20/2011 em uma rede de farmácias do município de Ponta Grossa – Paraná. *Visão Acadêmica*, v. 20 (1), p. 68-80, 2019.
- PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, v. 8 (4), p. 151-156, 1989.
- MCDANIELS, A. E. et al. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. *Applied and environmental microbiology*, v. 62 (9), p. 3350-3354, 1996.
- CLERMONT, O. et al. 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.
- JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 181 (1), p. 261-272, 2000.
- SIQUEIRA, A. K. et al. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Research in Veterinary Science*, v. 86, (2), p. 206-210, 2009.
- JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 295 (6-7), p. 383-404, 2005.
- QEKWANA, D. N. et al. Antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolates from dogs presented with urinary tract infections at a veterinary teaching hospital in South Africa. *Veterinary Research*, v. 14 (228), 2018.
- CHERVET, D. et al. Antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infections in Paris in 2015. *Médecine et maladies infectieuses*, v. 48, p. 188-192, 2018.
- TETZSCHNER, A. M. M. et al. In Silico Genotyping of *Escherichia coli* Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 58 (10), 2020.

APOIO:

