



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MIRELLA TOMAZ SOARES

**CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI*  
UROPATOGÊNICAS ISOLADAS DE CÃES E GATOS**

---

Londrina  
2021

MIRELLA TOMAZ SOARES

**CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI*  
UROPATOGÊNICAS ISOLADAS DE CÃES E GATOS**

Produtos apresentados ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias do Departamento de Clínicas Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Clínicas Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Souza Zanutto

Londrina  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S676 Soares, Mirella Tomaz .  
Caracterização de *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas de cães e gatos / Mirella Tomaz Soares. - Londrina, 2021.  
106 f. : il.

Orientador: Marcelo de Souza Zanutto.  
Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. Multirresistência - Tese. 2. Saúde pública - Tese. 3. Virulência - Tese. I. Zanutto, Marcelo de Souza. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias. III. Título.

CDU 619

MIRELLA TOMAZ SOARES

**CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI*  
UROPATOGÊNICAS ISOLADAS DE CÃES E GATOS**

Produtos apresentados ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias do Departamento de Clínicas Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Clínicas Veterinárias.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Marcelo de Souza Zanutto  
Universidade Estadual de Londrina

---

Profa. Dra Renata Katsuko Takayama Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por minha vida e por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais, que sem as quais não teria chegado até aqui.

À minha família, que sempre foi fonte inesgotável de apoio, carinho e incentivo. Meus pais Joaquim e Neli, exemplos de garra e perseverança, que não mediram esforços para proporcionar sempre o melhor para nossa família. À minha querida irmã Melissa, amiga e confidente mais atenciosa e incrível que eu poderia ter.

Aos meus amigos, que considero como parte de minha família, Giovana, Débora e Felipe, que acompanharam toda caminhada, dando suporte emocional e acadêmico. Assim como a amizade que o mestrado me proporcionou, Angélica, e pelas quais foi possível estreitar laços, Vanessa e Talyson. A contribuição dos mesmos em meu trabalho e minha vida sempre terá valor inestimável.

Ao meu orientador, Marcelo Zanutto, ao qual serei grata por toda minha existência, pois além de mentor e exemplo de profissional, foi o amigo, conselheiro e amparador nos momentos em que mais precisei.

Aos queridos professores Gerson Nakazato e Renata Kobayashi, por terem me recebido tão bem e oferecido todo suporte necessário para a realização desse trabalho. Não posso deixar de expressar aqui também minha gratidão aos colegas do laboratório (NIP3). Sendo importante destacar a contribuição elementar de Angela, que me acompanhou com muita paciência em todo início das análises e também, Leonardo, Gazal e Miriam, que tiveram importância capital durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao professor Ulisses de Pádua, pois sem sua contribuição não seria se quer possível dar início a esse trabalho. E aos técnicos de laboratório, Lucimara e Hamilton, responsáveis pela separação dos materiais que foram analisados. Agradeço a todos por toda paciência e solicitude em atender meus pedidos.

*“Aprender é a única coisa que a mente  
nunca se cansa, nunca tem medo e nunca  
se arrepende.”*

*Leonardo da Vinci*

SOARES, Mirella Tomaz. **Caracterização de *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas de cães e gatos**. 106 folhas. Dissertação de Pós-Graduação – Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

Foram apresentados quatro produtos, separados por capítulos, ao programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias. O primeiro produto intitulado “Caracterização de *Escherichia coli* uropatogênicas isoladas de cães e gatos”. A infecção de trato urinário é uma afecção comum na prática de animais de companhia. E dentre os diversos agentes envolvidos, a bactéria *Escherichia coli* é predominantemente isolada, tanto em infecções de trato urinário de cães quanto em gatos. Da forma mesma, está presente em prostatites caninas. Esse micro-organismo além de ser um importante comensal da microbiota intestinal, apresenta capacidade de causar infecções que podem inclusive favorecer uma transmissão interespecífica entre animais de companhia e humanos. E tem se observado uma frequência cada vez maior de bactérias multirresistentes. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo o isolamento, identificação de perfis de resistência antimicrobiana, genes de virulência e de grupos filogenéticos entre cepas de *E.coli* uropatogênica (UPEC) e duas de prostatite canina. Sendo possível identificar alta prevalência de UPEC em isolados de cães (66,67%) e gatos (40%), assim como nos dois isolados de prostatite canina. Dos fatores de virulência, houve alta prevalência dos genes *FyuA*, *iutA*, *Iss*, *ompT* e *hlyF*, tanto em cães como em gatos com infecção de trato urinário, sendo que apenas o *iutA* foi identificado em um dos isolados de prostatite. No tocante, classificação filogenética, o grupo B2 foi o mais frequente tanto em isolados de cães (42,85%) quanto de gatos (60%) com infecção de trato urinário. Pode-se constatar semelhança entre os dados relativos a genes de virulência e ilhas de patogenicidade encontrados no presente trabalho com outros, tanto em medicina veterinária quanto medicina humana, além de altas porcentagens de resistência. Este dado reforça o risco de disseminação de cepas multirresistentes entre animais de companhia e humanos, sendo um risco potencial para saúde pública. E reitera a necessidade de maiores avaliações entre as relações da presença de fatores de virulência e multirresistência para auxiliar na melhor compreensão e desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e prevenção dessas doenças. O segundo produto apresentado foi o primeiro produto citado neste parágrafo, formatado de acordo com as formas da revista “*One Health*”. O terceiro produto, uma revisão bibliográfica, formatada nas normas da revista “*Clínica Veterinária*” com o seguinte título: “*Escherichia coli* em cães e gatos e seu potencial zoonótico”. E por fim, o quarto produto, um relato de caso sobre gastrinoma, intitulado “*Canine pancreatic malignant gastrinoma associated with hyglycaemia and hyperinsulinemia*”. De maneira que este foi formatado de acordo com as normas da revista “*Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)*”.

**Plavras-chaves:** multirresistência, saúde pública, virulência.

SOARES, Mirella Tomaz. **Characterization of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats.** 106 sheets. Post graduate Dissertation – Professional Master’s in Veterinary Clinics – State University of Londrina, Londrina, 2021

## ABSTRACT

Four products were presented, separated by chapters, to the Professional Master's Graduate Program in Veterinary Clinics. The first product entitled “Characterization of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats”. Urinary tract infection is a common condition in the practice of companion animals. And among the various agents involved, the bacterium *Escherichia coli* is predominantly isolated, both in urinary tract infections of dogs and cats. Likewise, it is present in canine prostatitis. This microorganism, in addition to being an important commensal of the intestinal microbiota, has the ability to cause infections that can even favor interspecific transmission between pets and humans. And an increasing frequency of multidrug-resistant bacteria has been observed. Therefore, the present work aimed to isolate and identify antimicrobial resistance profiles, virulence genes and phylogenetic groups between strains of uropathogenic *E.coli* (UPEC) and two strains of canine prostatitis. It was possible to identify a high prevalence of UPEC in isolates from dogs (66.67%) and cats (40%), as well as in the two isolates of canine prostatitis. Regarding virulence factors, there was a high prevalence of *FyuA*, *iutA*, *Iss*, *ompT* and *hlyF* genes, both in dogs and cats with urinary tract infection, and only *iutA* was identified in one of the prostatitis isolates. Regarding phylogenetic classification, group B2 was the most frequent in isolates from both dogs (42.85%) and cats (60%) with urinary tract infection. Similarity can be seen between the data related to virulence genes and pathogenicity islands found in the present work with others, both in veterinary and human medicine, in addition to high percentages of resistance. This data reinforces the risk of dissemination of multidrug-resistant strains between companion animals and humans, representing a potential risk to public health. And it reiterates the need for further evaluations between the relationship between the presence of virulence factors and multidrug resistance to assist in a better understanding and development of new techniques for diagnosis and prevention of these diseases. The second product presented was the first product mentioned in this paragraph, formatted according to the forms of the magazine “One Health”. The third product, a bibliographic review, formatted in the norms of the journal “Clínica Veterinária” with the following title: “*Escherichia coli* in dogs and cats and its zoonotic potential”. And finally, the fourth product, a case report on gastrinoma, entitled “Canine pancreatic malignant gastrinoma associated with hyglycaemia and hyperinsulinemia”. So that it was formatted according to the norms of the journal “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)”.

**Keywords:** multidrug resistance, public health, bacteria.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGÊNICAS ISOLADAS DE CÃES E GATOS

ITU	Infecção do trato urinário
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
PAIs	Ilhas de patogenicidade
<i>Omps</i>	Proteínas de membrana externa
<i>Hly</i>	Alfa-hemolisina
<i>CNF1</i>	Fator de necrotização citotóxica 1
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
Kb	Quilobase
UEL	Universidade Estadual de Londrina
HV	UEL – Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina
CCB-UEL	Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina
BHI	Meio de cultura Brain Heart Infusion
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
MDR	Resistentes a múltiplos fármacos
XDR	Extensivamente resistentes
PDR	Pan-drogarresistentes
ESBL	<i>Extended Spectrum <math>\beta</math>-lactamases</i>
AmpC	<i>AmpC <math>\beta</math>-lactamases</i>
°C	Grau Celsius
Rpm	Rotação por minuto
$\mu$ l	Microlitro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
U	Unidade
mM	Milimolar
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
®	Marca registrada
UV	Ultravioleta

SRD	Sem raça definida
M	Machos
F	Fêmea
NR	Não relatado
TVT	Tumor venéreo transmissível
DRA	Doença renal aguda
DRC	Doença renal crônica
DTUIF	Doença do trato urinário inferior felino
HPB	Hiperplasia prostática benigna
Atb	Antibiótico
ΣAtb	Soma de classes de antibióticos resistentes
AMR	Resistência a antimicrobianos
AMP	Ampicilina
ATM	Aztreonam
IPM	Imipenem
AMC	Amoxiciclina com clavulanato de potássio
CFL	Cefalotina
CFO	Cefoxitina
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
CPM	Cefepime
CIP	Ciprofloxacina
ENO	Enrofloxacina
GEN	Gentamicina
SUT	Sulfazotrim (sulfametoxazol com trimetoprim)
CLO	Cloranfenicol
TET	Tetraciclina
NIT	Nitrofurantoína
S	Sensível
+/-	Positivo ou negativo, de acordo com a característica avaliada
ISCAID	<i>International Society for Companion Animal Infectious Diseases</i>
%	Porcentagem

## **CAPITULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGÊNICAS ISOLADAS DE CÃES E GATOS – VERSÃO PARA SUBMISSÃO REVISTA “*ONE HEALTH*”**

ITU	Infecção do trato urinário
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
PAIs	Ilhas de patogenicidade
<i>Omps</i>	Proteínas de membrana externa
<i>HlyA</i>	Alfa-hemolisina
<i>CNF1</i>	Fator de necrotização citotóxica 1
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
Kb	Quilobase
UEL	Universidade Estadual de Londrina
HV – UEL	Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina
CCB-UEL	Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina
BHI	Meio de cultura <i>Brain Heart Infusion</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
MDR	Resistentes a múltiplos fármacos
ESBL	<i>Extended Spectrum <math>\beta</math>-lactamases</i>
AmpC	<i>AmpC <math>\beta</math>-lactamases</i>
°C	Grau Celsius
Rpm	Rotação por minuto
$\mu$ l	Microlitro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
U	Unidade
mM	Milimolar
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
®	Marca registrada
UV	Ultravioleta

## **CAPÍTULO 3 – *ESCHERICHIA COLI* EM CÃES E GATOS E SEU POTENCIAL ZONÓTICO - REVISÃO DE LITERATURA**

ESBL	<i>Extended Spectrum <math>\beta</math>-lactamases</i>
AmpC	AmpC $\beta$ -lactamases
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarrreioogênicas
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Extraintestinal
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
SHU	Síndrome hemolítico-urêmica
ITU	Infecção de Trato Urinário
OMS	Organização Mundial da Saúde
%	Porcentagem

#### **CAPÍTULO 4 – CANINE PANCREATIC MALIGNANT GASTRINOMA ASSOCIATED WITH HYPGLYCAEMIA AND HYPERINSULINEMIA: CASE REPORT**

Kg	Kilograma
°C	Celsius degree
uL	Microliter
mg/dL	Milligram for kilogram
AF	Alkaline phosphatase
ALT	Alanine aminotransferase
mL	Milliliter
®	Trademark
mg/kg	Milligram for kilogram
SC	Subcutaneous
BID	Twice a day
TID	Three times a day
g/dL	Gram per decilitre
NSE	Neuron-Specific Enolase
MEN 1	Multiple Endocrine Neoplasms

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> UROPATOGÊNICAS ISOLADAS DE CÃES GATOS</b> .....	15
1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	<i>Escherichia coli</i> .....	17
1.2	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal (ExPEC).....	17
1.3	Fatores de virulência.....	18
1.3.1	Adesinas.....	18
1.3.2	Toxinas .....	19
1.3.3	Aquisição de ferro.....	19
1.4	Ilhas de patogenicidade.....	20
1.5	Classificação filogenética .....	21
1.6	Resistência antimicrobiana .....	21
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	23
2.1	Amostras e isolados bacterianos .....	23
2.2	Teste de sensibilidade aos antimicrobiana.....	25
2.2.1	Detecção de produtoras de $\beta$ - lactamases de espectro estendido (ESBL) e AmpC .....	26
2.3	Detecção de genes de virulência, ilhas de patogenicidade e classificação filogenética usando reação em cadeia da polimerase (PCR).....	26
2.3.1	Extração de DNA.....	26
2.3.2	Detecção dos genes de virulência por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	27
2.3.3	Detecção de ilhas de patogenicidade (PAI).....	28
2.3.4	Classificação filogenética .....	28
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.1	Características clínico-epidemiológicas .....	29
3.2	Sensibilidade aos antibióticos.....	30
3.3	Fatores de virulência, ilhas de patogenicidade e classificação filogenética .....	36
5	CONCLUSÃO .....	44
	REFERÊNCIAS .....	44

	<b>CAPITULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> UROPATOGÊNICAS ISOLADAS DE CÃES GATOS – VERSÃO PARA SUBMISSÃO REVISTA “ONE HEALTH”</b> .....	53
1	INTRODUÇÃO .....	55
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	55
2.1	Isolados e bacterianos .....	55
2.2	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	56
2.3	Detecção dos genes de virulência por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	56
2.4	Detecção de ilhas de patogenicidade (PAI) .....	57
2.5	Classificação filogenética .....	57
3	RESULTADOS .....	57
3.1	Características clínico-epidemiológicas .....	57
3.2	Sensibilidade aos antimicrobianos.....	58
3.3	Distribuições de fatores de virulência e ilhas de patogenicidade .....	59
3.4	Classificação filogenética .....	61
4	DISCUSSÃO .....	61
4.1	Características clínico-epidemiológicas .....	61
4.2	Sensibilidade aos antimicrobianos.....	62
4.3	Fatores de virulência, ilhas de patogenicidade e classificação filogenética .....	63
5	CONCLUSÃO .....	66
	REFERÊNCIAS .....	66

	<b>CAPÍTULO 3 – <i>ESCHERICHIA COLI</i> EM CÃES E GATOS E SEU POTENCIAL ZONÓTICO – REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	72
	Introdução .....	74
1	<i>Escherichia coli</i> .....	75
2	<i>Escherichia coli</i> e relevância em saúde pública .....	77
2.1	Interação entre o homem e animais de companhia (cães e gatos) .....	77
2.2	Transmissão entre espécies .....	77
3	Resistência antimicrobiana .....	79
3.1	Importância das cepas produtoras de $\beta$ - lactamases de amplo espectro em infecções por <i>E. coli</i> .....	80
3.2	Fatores de risco associados a infecções por <i>Escherichia coli</i> multirresistentes ...	82
3.3	Distribuição geográfica de cepas de <i>E. coli</i> multirresistente .....	83

4	Medidas profiláticas na disseminação de <i>Escherichia coli</i> .....	84
	Considerações finais .....	86
	Referências .....	86

	<b>CAPÍTULO 4 – CANINE PANCREATIC MALIGNANT GASTRINOMA ASSOCIATED WITH HYPOGLYCAEMIA AND HYPERINSULINEMIA: CASE REPORT</b> .....	96
	INTRODUCTION .....	97
	CASE REPORT .....	98
	DISCUSSION .....	102
	CONCLUSION .....	105
	REFERENCES .....	106

**CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI*  
UROPATOGÊNICAS ISOLADAS DE CÃES GATOS**

## 1 INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é comum na prática clínica de animais de companhia. A incidência da doença no cão foi relatada como 14% e em gatos entre 3% a 19%. Os principais fatores de riscos são sexo, idade, comorbidades e anormalidades funcionais do trato urinário inferior (BYRON, 2019). Além disso, animais com sistema imune comprometido apresentam maior risco de desenvolver a doença (QEKWANA et al., 2018; DORSCH; TEICHMANN-KNORM; LUND, 2019).

As ITU's ocorrem quando há quebra dos mecanismos de defesa do hospedeiro e um micro-organismo patogênico adere, multiplica e persiste em uma porção do trato urinário. As defesas do trato urinário incluem desde a micção normal, barreira mucosa, estruturas anatômicas, propriedades da urina e imunocompetência sistêmica. As infecções mais comuns são as causadas por bactérias, contudo fungos e vírus também podem infectar o trato urinário. As infecções podem ser classificadas de acordo com a localização anatômica, sendo a infecção de trato urinário superior àquela que acomete ureteres e rins e de trato urinário inferior a que atinge vagina, uretra e/ou bexiga (OLIN; BARTGES, 2015; QEKWANA et al., 2018).

A ITU está entre as principais causas de morbidade em cães e gatos e entre os principais motivos para utilização de antimicrobianos. A instituição de terapias inadequadas pode acarretar em diversas consequências maléficas para saúde de cães e gatos, por causar falha terapêutica e desenvolvimento de resistência, econômica por conta da necessidade de prolongar o tratamento e para a saúde pública, visto que a resistência antimicrobiana gera consequências para a saúde da comunidade (WEESE et al., 2019).

As bactérias que mais frequentemente causam ITU's em cães e gatos são semelhantes. A maioria das infecções urinárias em cães e gatos é causada por um único agente (75%), sendo *Escherichia coli* (*E.coli*) a mais comum, seguido por cocos Gram-positivos, como *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* e *Enterococcus* spp, sendo também encontrado *Proteus* spp, *Klebsiella* spp, *Pasteurella* spp, *Pseudomonas* spp e *Corynebacterium* spp (OLIN; BARTJEGES, 2015; FRANCO, 2017; BYRON, 2019). Apesar de na maioria das vezes as infecções serem causadas por um único agente, tanto em cães quanto em gatos, podem ocorrer infecções bacterianas mistas (FRANCO, 2017).

Outra afecção em que a *E. coli* pode atuar como agente infeccioso é a prostatite bacteriana. Essa doença se caracteriza por ser uma condição crônica ou aguda e ocorre principalmente em cães machos inteiros. E na maioria dos casos, o paciente pode apresentar concomitante cistite bacteriana. De maneira que os patógenos isolados na ITU são os mesmos encontrados na prostatite, sendo a *E. coli* a mais comumente isolada (NELSON; COUTO, 2015).

### **1.1 *Escherichia coli***

*E. coli* é um bacilo Gram-negativo, pertencente à família Enterobacteriaceae, anaeróbio facultativo, não formador de esporos, fermentador de glicose e outros açúcares (FRANCO, 2017). Considerado um dos micro-organismos mais versáteis, pois embora seja um importante comensal da microbiota intestinal normal, existem outras variáveis capazes de causar infecções (BÉLANGER et al., 2011; PITOUT, 2012; RILEY, 2014; BOURNE, CHONG, GORDON, 2019). Inclusive é capaz de causar desde infecções intestinais, definidas na Medicina Humana por *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* shiga toxina (STEC), *E. coli* necrotoxigênica (NTEC), *E. coli* hemolítica associada à diarreia (DHEC), dentre outras; até em outros sítios pela cepa *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC), e isto é definido à partir de suas propriedades de virulência e locais da infecção (TOVALI et al., 2014; MAINIL, 2013; FRANCO, 2017).

### **1.2 *Escherichia coli* patogênica extraintestinal (ExPEC)**

*Escherichia coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) representa um grupo importante de diversas infecções tanto em animais quanto humanos, incluindo ITUs, meningite e septicemia (BÉLANGER et al., 2011).

ExPEC associada à ITU decorre principalmente do próprio reservatório fecal do hospedeiro. A infecção ocorre após a migração da ExPEC do trato gastrointestinal, por meio da colonização uretral até o trato urinário, onde alcança bexiga e rins e a invasão desses tecidos resulta em síndromes clínicas. De forma que bactérias retais, perineais e genitais são os principais reservatórios de infecção (DALE; WOODFORD, 2015; OLIN; BARTGES, 2015). A microbiota fecal de humanos e animais é então considerada um reservatório para *E. coli* uropatogênica (UPEC), de forma que tais cepas

podem atravessar as barreiras interespecies e colonizar efetivamente tanto animais de companhia (cães e gatos), quanto humanos (JOHNSON et al., 2008; JONSON et al., 2009).

As infecções causadas por UPEC diferem das cepas intestinais pelos seus fatores de virulência, permitindo uma transição bem sucedida do trato intestinal para o trato urinário (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004; BIELECKI et al., 2014; QEKWANA et al., 2018).

### **1.3 Fatores de virulência**

Os fatores de virulência incluem uma ampla variedade de moléculas produzidas por micro-organismos patogênicos, que aumentam sua capacidade de colonização e evasão das defesas do hospedeiro e causam doenças (LEITÃO, 2020). Estes componentes desempenham um papel crítico na patogênese da ITU, e incluem componentes estruturais de superfície, como adesinas e fimbrias, toxinas, hemolisinas, mecanismos para a subversão das defesas do hospedeiro, e múltiplos sistemas de aquisição de ferro (LUO et al., 2012; TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEL, 2017). Os fatores de virulência são codificados no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos (DALE; WOODFORD, 2015; KARAM; HABIBI; BOUZARI, 2019).

Dessa forma, o processo de infecção envolve diversas fases, nas quais a *E. coli* interage com a célula hospedeira, cada uma promovida por diferentes fatores de virulência. E apesar de vários fatores muitas vezes não serem indispensáveis, podem conferir alguma vantagem durante determinado estágio da infecção (LUTHJE; BRAUNER, 2014).

A identificação dos fatores de virulência associados à ITU é importante na diferenciação entre uma cepa uropatogênica e uma comensal (BIELECKI et al., 2014).

#### **1.3.1 Adesinas**

A aderência firme às células uroepiteliais é um requisito essencial para estabelecimento de infecção, seguida pela invasão e multiplicação bacteriana nas células hospedeiras. Os receptores nas células uroepiteliais para adesão das bactérias são as uroplacinas, presentes na superfície luminal da bexiga e ureteres (LUTHJE; BRAUNER, 2014). E a adesão a essas células hospedeiras pode ser realizada por

estruturas ou moléculas de superfície, como adesinas fimbriais, adesinas afimbriais e/ou proteínas da membrana externa (*Omps*) (JACQUES, 2013).

Dentre as organelas de adesão, temos as fímbrias do tipo 1, que se ligam facilmente às uroplacinas (células uroepiteliais da bexiga); fímbrias P, que possuem maior especificidade pelo trato urinário superior; fímbrias de curli, que representa um dos principais componentes do biofilme em *E.coli*; adesinas *Afa*, que são frequentemente associadas à infecções intestinais, dentre outras (LUTHJE; BRAUNER, 2014).

A expressão de algumas adesinas não é específica para ExPEC, no entanto, as cepas de UPEC carregam uma quantidade significativamente maior de agrupamento de genes fimbriais em comparação com as cepas comensais (BÉLANGER et al., 2011; SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015).

### **1.3.2 Toxinas**

As toxinas são responsáveis por auxiliar na disseminação do patógeno para os tecidos mais profundos após romper a integridade celular para obtenção dos nutrientes presentes dentro das células hospedeiras, além de destruição das células do sistema imunológico, evitando dessa forma, a atividade antibacteriana. E em resposta a essa atividade tóxica também pode haver uma forte reação inflamatória (LUTHJE; BRAUNER, 2014).

Essas toxinas incluem alfa-hemolisina (*HlyA*), fator de necrotização citotóxica 1 (*CNFI*) e toxinas autotransportadoras, e causam na forma ou função das células hospedeiras, interrupção do ciclo celular ou lise celular (KARAM; HABIBI; BOUZARI, 2019).

### **1.3.3 Aquisição de ferro**

A disponibilidade de ferro no trato urinário é bem restrita, dessa forma, as bactérias necessitam de sistemas de aquisição de ferro para sua sobrevivência (LUTHJE; BRAUNER, 2014; TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEL, 2017). Essa necessidade vital de aquisição de ferro pela *E.coli* no trato urinário é suprida por uma forte regulação positiva dos genes que codificam sistemas de aquisição de ferro durante a ITU (LUTHJE; BRAUNER, 2014).

A limitação de ferro no trato urinário é um dos mecanismos de defesa inata do hospedeiro contra sobrevivência de bactérias, onde o ferro está ligado à glicoproteínas, como transferrina e lactoferrina, ou incorporado a porções heme de proteínas, como hemoglobina e mioglobina (SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015). Este ferro pode ser obtido após a lise dos eritrócitos pela hemolisina e a aquisição realizada por receptores de heme, como *ChuA* e *Hma*, presentes na membrana externa de algumas *E.coli* (LUTHJE; BRAUNER, 2014; SUBASHCHANDRABOSE; MOBLEY, 2015).

A obtenção do ferro também pode ser realizada por sideróforos, que são moléculas quelantes de ferro e a aquisição é realizada por meio de receptores específicos na membrana externa (LUTHJE; BRAUNER, 2014; TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEL, 2017). Quatro sistemas sideróforos foram investigados em UPEC no contexto de infecção e são eles: salmochelina e seu receptor *IroN*; aerobactina e *iutA*; enterobactina e *FebA*; e yersiniabactina e *FyuA* (LUTHJE; BRAUNER, 2014).

A alta prevalência de sistemas de aquisição de ferro tanto na UPEC quanto na *E. coli* comensal dificulta estabelecer a real contribuição desses sistemas para urovirulência ou classificá-los como fatores de virulência (LUTHJE; BRAUNER, 2014). Mas apesar de nenhum desses sistemas serem indispensáveis para infecção bem-sucedida, resultados em estudos epidemiológicos demonstraram a importância desses sistemas para persistência da bactéria no trato urinário, visto que estão altamente relacionados às cepas persistentes em comparação às infecções esporádicas (EJRNAES et al., 2012; LUO et al., 2012).

#### **1.4 Ilhas de patogenicidade**

As PAI's são elementos genéticos móveis compostos por grandes blocos de DNA (>10 kb), que contêm sequências de integrases e transposases, e possuem um conteúdo G + C que difere do genoma bacteriano do hospedeiro (SABATÉ et al., 2006). Também conhecidas por ilhas genômicas, essas regiões codificam diversas funções, que dependem em grande parte do ambiente em que a bactéria cresce. Ademais, carregam grupos de genes de virulência, que contribuem para a patogenicidade da bactéria, e no caso da *E. coli*, essas ilhas possibilitaram a adaptação à ambientes específicos e causar doenças (SCHMIDT; HELSEL, 2004).

## 1.5 Classificação filogenética

Essas cepas extraintestinais pertencem principalmente aos grupos filogenéticos B2 e D, diferenciando-as das cepas comensais, que estão em sua maior parte inclusas nos grupos A e B1 (OSUGUI et al., 2014; RAEISPOUR; RANJBAR, 2018). Atualmente existem oito filo-grupos reconhecidos de *E. coli*, com sete pertencentes a *E. coli sensu stricto* (A, B1, B2, C, D, E, F) e um correspondente a *E. coli* clade I (CLERMONT et al., 2013).

## 1.6 Resistência antimicrobiana

A terapia para as ITU's é realizada com base no uso de antibióticos e os mesmos devem ser selecionados considerando determinadas características, como padrão de susceptibilidade da bactéria isolada ao antibiótico testado, tipo de infecção, condições do paciente, como idade, doenças subjacentes, consumo anterior de antibióticos, uso de outros medicamentos, histórico de infecções urinárias anteriores e local da infecção (bexiga, rim ou próstata) (KARAM; HABIBI; BOUZARI, 2019).

O tratamento de ITU's causadas por ExPEC é complicado pela capacidade dessa bactéria invadir as células uroepiteliais, onde ficam protegidas contra os efeitos da maioria dos antibióticos. Assim, a formação de reservatórios intracelulares dificulta ainda mais a eliminação completa do patógeno do trato urinário (LEWIS; RICHARDS; MULVEY, 2016).

A prática de prescrever antibióticos para tratamento de infecções de trato urinário sem caracterização da bactéria teve como consequência o aumento da resistência entre os uropatógenos e à redução da eficácia das terapias orais (TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEL, 2017).

O aumento de infecções por bactérias multirresistentes (isolados resistentes a três ou mais categorias antimicrobianas) em animais de companhia é uma preocupação cada vez mais frequente. Este fato causa dificuldades terapêuticas em medicina veterinária, além do problema em saúde pública visto que esses patógenos podem ser zoonóticos, devido à proximidade filogenética entre as diversas estirpes isoladas em humanos e animais de companhia como cães e gatos (WESSE et al., 2011; MARQUES et al., 2016; FRANCO, 2017). A resistência antimicrobiana limita as opções de

tratamento, aumentando também a falha terapêutica (CUMMINGS, APREA, ALTIER, 2015).

Há evidências de que o contato direto entre humanos e animais de companhia pode levar à transmissão interespecífica de bactérias patogênicas, incluindo cepas com resistência antimicrobiana. A disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos pode ocorrer indiretamente pelo ambiente doméstico, ou diretamente pelo contato entre pele e pêlos contendo materiais com essas bactérias (MARTINS et al., 2013; CUMMINGS, APREA, ALTIER, 2015).

Ao atingir novo hospedeiro, as bactérias resistentes podem colonizar e infectar, ou apenas permanecer neste ambiente por um período curto de tempo. E durante este período disseminar seus genes de resistência e aceitar genes de resistência de outras bactérias (MARTINS et al., 2013).

Os conhecimentos sobre transferência horizontal são limitados visto que não há vigilância sobre a resistência antimicrobiana entre as cepas de *E. coli*. Essas informações podem auxiliar na seleção empírica de agentes microbianos no tratamento de cães e gatos e informar ainda mais sobre uso criterioso de antimicrobianos na prática de animais de companhia (CUMMINGS, APREA, ALTIER, 2015).

O uso de técnicas moleculares auxilia na coleta de evidências crescentes de que os animais podem constituir um reservatório de ExPEC sendo dessa forma uma ameaça à saúde humana. Além de que podem propagar a resistência microbiana, aumentando assim, o risco de incidência de infecções humanas e complicações ao longo do tratamento. Dessa forma é imprescindível estar ciente desse risco para que se possa planejar medidas de ação para prevenir tais implicações (BÉLANGER et al., 2011). A Organização de Saúde Animal alerta que os veterinários devem adotar estratégias para a redução da resistência microbiana e promoção do uso racional de antimicrobianos, logo, informações sobre a etiologia e resistência antimicrobiana de acordo com a região são de extrema importância (MARQUES et al., 2016). Sendo assim, é importante levantar informações locais de padrões de resistência a antibióticos, pois elas podem mostrar diferenças de acordo com tempo e região (KLINGEBERG et al., 2018).

Diante da importância da caracterização de genes e identificação de perfis de resistência antimicrobiana de *E. coli* urinária, o objetivo deste estudo foi o isolamento e a identificação dos perfis de resistência antimicrobiana, genes de virulência, ilhas de patogenidade e grupos filogenéticos entre cepas de *E. coli* isoladas de ITU's de cães e

gatos, e prostatite de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL) no período de 2015 a 2020.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras e isolados bacterianos

Neste estudo foram utilizados 28 isolados de *E.coli*, provenientes de 25 pacientes, 23 de animais com ITU e dois com infecção prostática. As amostras de urina e líquido prostático foram coletadas pelos médicos veterinários do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL), no período de 2015 a 2020, com intuito de apoiar o diagnóstico e conduta terapêutica. Os dados referentes a número da amostra, espécie, raça, sexo, idade e doenças associadas estão distribuídos na Tabela 1.

Após o isolamento e identificação de *E. coli* nas amostras de urina e líquido prostático, os isolados foram acondicionados em recipientes estéreis e mantidos refrigerados, em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco®) mais 20% de glicerol (Sigma®) a -80°C, no laboratório de microbiologia do HV-UEL. E posteriormente processados no laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (CCB-UEL). E então realizada a cultura e identificação de cepas bacteriana, de cada isolado, teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, detecção de genes de virulência, ilhas de patogenicidade e classificação filogenética por meio da reação em cadeia da polimerase.

**Tabela 1** – Caracterização dos animais (cães e gatos) amostrados e doenças associadas à ITU e prostatite causados por *E. coli*, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL), no período de 2015 à 2020.

Isolados	Espécie	Raça	Sexo	Idade	Doença de base
01	Felina	SRD	M	2 anos	Cistite intersticial felina Sondado com atb
02	Canina	SRD	F	12 anos	TVT
04	Canina	Yorkshire	F	3 anos	Insuficiência renal e hepatopatia
05	Canina	SRD	M	5 anos	Cistite, HPB
06	Canina	Pinscher	F	4 anos	Insuficiência renal aguda (DRA)
07	Canina	Maltês	M	2 anos	Shunt portossistêmico
08	Canina	Boxer	M	13 anos	Hérnia de disco
09 e 10	Canina	Poodle	F	9 anos	Insuficiência renal crônica (DRC)
11	Canina	SRD	M	9 anos	Cistite
12	Felina	SRD	M	3,5 anos	Cistite intersticial felina
13	Canina	SRD	M	12 anos	Doença infecciosa (leptospirose) e prostatite
14	Canina	SRD	M	10 anos	Sertolioma
15	Canina	Teckel	M	9 anos	Hérnia de disco
16	Canina	SRD	M	4 anos	Hiperplasia prostática benigna
17	Canina	SRD	M	5,6 anos	Hiperplasia prostática benigna, cálculos vesicais
18	Canina	Poodle	F	NR	NR
19	Felino	SRD	M	2 anos	Anomalia anatômica (castração precoce)
20	Canino	SRD	M	8 anos	Insuficiência renal crônica (DRC)
21	Felino	SRD	M	7 anos	DTUIF Urolítiase e anomalia anatômica (anomalia prepucial)
23	Canina	Shitzu	F	7 anos	Cálculo vesical
24	Canina	Poodle	F	NR	NR
25	Canina	SRD	F	Adulta	NR
26	Canina	Schnauzer	F	9 anos	Cálculo vesical
27	Canina	SRD	F	Adulta	TVT
28	Canina	Bulldog	F	NR	NR
<b>TOTAL</b>				25 animais	

*Legenda:* SRD – Sem Raça Definida; M- Macho; F – Fêmea; NR – Não relatado; TVT – Tumor venéreo transmissível, HPB – Hiperplasia prostática benigna, DRA – Doença renal aguda, DRC – Doença renal crônica, DTUIF – Doença do trato urinário inferior felino.

## 2.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *E.coli* foi processado pelo uso do método de difusão em disco, em ágar Mueller-Hinton, de acordo com protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Nesse método, os agentes antimicrobianos de escolha para este estudo têm atividade farmacológica contra *E. coli* e são clinicamente relevantes na Clínica de Pequenos Animais, seja pelo uso terapêutico, ou como marcadores de susceptibilidade de agentes comumente utilizados. Foram testados os antimicrobianos: amoxicilina com clavulanato de potássio, aztreonam, ampicilina, cefalotina, cefotaxima, cefepime, cefoxitina, ceftriaxona, ciprofloxacina, cloranfenicol, enrofloxacina, gentamicina, imipenem, nitrofurantoína, sulfametaxazol+trimetoprim, tetraciclina (Tabela 2).

**Tabela 2** – Lista de antimicrobianos, separados por classe, selecionados para o teste de sensibilidade dos isolados de *E.coli* de ITU de cães e gatos e prostatite em cães, atendidos no HV-UEL, no período de 2015 a 2020.

		SUBCLASSES		ANTIMICROBIANO	
<b>CLASSES</b>	<b>BETALACTÂMICOS</b>	Penicilinas	Aminopenicilina	Ampicilina	
			Monobalactâmico	Aztreonam	
		Carbapenêmicos		Imipenem	
		Inibidor de $\beta$ - lactamase		Amoxicilina com clavulanato de potássio	
		Cefalosporinas	1ª geração	Cefalotina	
			2ª geração	Cefotixina	
			3ª geração	Ceftriaxona Cefotaxima	
			4ª geração	Cefepime	
		<b>FLUORQUINOLONAS</b>		2ª geração	Ciprofloxacina Enrofloxacina
		<b>AMINOGLICOSÍDEO</b>	-		Gentamicina
	<b>SULFONAMIDA</b>	-		Sulfazotrim	
	<b>ANFENICÓIS</b>	-		Cloranfenicol	
	<b>TETRACICLINA</b>	-		Tetraciclina	
<b>NITROFURANTOÍNA</b>	-		Nitrofurantoína		

Para determinar os perfis de sensibilidade dos isolados seguiram-se os procedimentos do CLSI para classificação (CLSI 2007, CLSI 2011, CLSI 2010). E com base nas avaliações laboratoriais, os isolados de *E. coli* foram classificados como sensíveis, intermediários ou resistentes. De maneira que isolados que exibiram resistência intermediária foram reclassificados como resistentes. A classificação foi realizada conforme Magiorakos e colaboradores (2012), em resistentes a múltiplos fármacos (MDR), aquelas amostras com resistência a pelo menos um agente, em mais de três categorias antimicrobianos; extensivamente resistentes (XDR), quando resistentes a pelo menos um agente em quase todas as categorias de antimicrobianos, com exceção de duas ou menos; e por fim, pan-drogarresistentes (PDR), bactérias resistentes a todos os agentes em todas as categorias de antimicrobianos.

### **2.2.1 Detecção de produtoras de $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) e AmpC**

A semeadura dos isolados bacterianos na placa de ágar Mueller-Hinton de acordo com a turbidez da escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  bactérias/ml) e os discos de cefepime, aztreonam, cefotaxima, ceftriaxona foram colocados em torno de um disco de amoxicilina com clavulanato de potássio com distância de 30 mm (centro a centro) para a confirmação de produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) por teste de sinergia de disco duplo, conforme descrito pelas diretrizes do CLSI.

Os testes fenotípicos para detecção de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC não são padronizados pelo CLSI, mas geralmente são baseados na resistência as cefamicinas (cefexitina) e a todos os inibidores de  $\beta$ -lactamases.

### **2.3 Detecção de genes de virulência, ilhas de patogenicidade e classificação filogenética usando reação em cadeia da polimerase (PCR)**

#### **2.3.1 Extração de DNA**

As estirpes foram cultivadas em Ágar Triptona de Soja (Difco®) à 37°C sob agitação (150 rpm). O DNA foi extraído por suspensão de cinco colônias bacterianas em 200  $\mu$ l de água estéril que foi fervida por 10 minutos e centrifugada a 1500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado como modelo nos ensaios de PCR.

### 2.3.2 Detecção dos genes de virulência por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os iniciadores que foram utilizados para amplificação dos fragmentos de DNA responsáveis pelas características de virulência estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** – Lista de iniciadores de PCR utilizados para amplificação dos fragmentos de DNA, na detecção de fatores de virulência dos isolados de *E.coli* de ITU de cães e gatos e prostatite em cães, atendidos no HV-UEL, no período de 2015 a 2020.

Gene	Seqüência do iniciador (5'→3')	Fragmento (bp)	Referência
<i>iroN</i>	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT GTTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	553	JOHNSON <i>et al</i> , 2008.
<i>ompT</i>	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	496	JOHNSON <i>et al</i> , 2008
<i>hlyF</i>	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	450	JOHNSON <i>et al</i> , 2008
<i>Iss</i>	CAGCAACCCGAACCACTTGATG AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323	JOHNSON <i>et al</i> , 2008
<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	JOHNSON <i>et al</i> , 2008
<i>hlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGC ACCATATAAGCGGTCATTCCTCGTC	1177	JOHNSON e STELL, 2000.
<i>FyuA</i>	TGATTAACCCGCGACGGAA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	880	JOHNSON e STELL, 2000.

A amplificação do DNA bacteriano foi realizada utilizando 2,5 µl de sobrenadante em 12,5 µl de mistura de reação, que continha 1,2 U Taq polimerase (Invitrogen®), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão de PCR 10X (Invitrogen®) e os iniciadores necessários. As amostras foram submetidas à PCR em um termociclador (Applied Biosystems®).

Em seguida, dez microlitros de cada mistura da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, seguido de coloração com 1 µl de gel Red 20x (Biotium®) (1:500) e feita a visualização em transiluminador UV. E dessa forma uma escala de DNA de 1 Kb (Invitrogen®) foi corrida em cada gel.

### 2.3.3 Detecção de ilhas de patogenicidade (PAI)

Foram analisadas cinco PAI's por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR): PAI IV536, PAI IICFT073, PAI I 536, PAI II536 e PAI IJ96. Os iniciadores que foram utilizados para amplificação dos PAI's responsáveis pelas características de virulência se encontram na Tabela 4. As amostras foram submetidas à PCR em um termociclador (Applied Biosystems®) com temperatura de hibridação de 55°C conforme utilizado por Sabaté e colaboradores (2006).

**Tabela 4** – Iniciadores de iniciadores de PCR utilizados para detecção de ilhas de patogenicidade dos fragmentos de DNA, na detecção de fatores de virulência dos isolados de *E.coli* de ITU de cães e gatos e prostatite em cães, atendidos no HV-UEL, no período de 2015 a 2020.

PAI	Gene	Sequência do iniciador (5'→3')	Fragmento(bp)	Referência
PAI IV536	<i>irp2</i>	AAG GAT TCG CTG TTA CCG GAC TCG TCG GGC AGC GTT TCT TCT	300	SABATÉ <i>et al.</i> , 2006
PAI IICFT073	<i>cfi073.2</i>	ATG GAT GTT GTA TCG CGC ACG AGC ATG TGG ATC TGC	400	SABATÉ <i>et al.</i> , 2006
PAI I536	<i>I9</i> <i>I10</i>	TAA TGC CGG AGA TTC ATT GTC AGG ATT TGT CTC AGG GCT TT	1800	SABATÉ <i>et al.</i> , 2006
PAI II536	<i>orf1up</i> <i>orf1down</i>	CAT GTC CAA AGC TCG AGC C CTA CGT CAG GCT GGC TTT G	1000	SABATÉ <i>et al.</i> , 2006
PAI IJ96	<i>papGI</i>	TCG TGC TCA GGT CCG GAA TTT TGG CAT CCC ACA TTA TCG	400	SABATÉ <i>et al.</i> , 2006

### 2.3.4 Classificação filogenética

A classificação filogenética em grupos foi realizada conforme o método desenvolvido por Clermont e colaboradores (2013), de forma que os isolados foram classificados em sete grupos (A, B1, B2, C, D, E e F) e um correspondente a *E. coli* clade I, com base na presença dos genes *chuA*, *yjaA* e *arpA* e um fragmento de DNA (TSPE4.C2), detectados pelo método PCR (CLERMONT *et al.*, 2013) (Tabela 5).

**Tabela 5** – Iniciadores de PCR utilizados para a classificação filogenética dos fragmentos de DNA, na detecção de fatores de virulência dos isolados de *E.coli* de ITU de cães e gatos e prostatite em cães, atendidos no HV-UEL, no período de 2015 a 2020.

Gene	Sequência do iniciador (5'→3')	Fragmento (bp)	Referência
<i>ChuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288	Clermont et al., 2013
<i>YjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211	Clermont et al., 2013
<i>TSPE4.C2</i>	CACTATTCGTAAGGTCATCC AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC	152	Clermont et al., 2013
<i>arpA</i>	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	301	Clermont et al., 2013

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Características clínico-epidemiológicas

Foram obtidas 28 cepas de *E. coli*, 26 (92,9%) oriundas de ITU e duas (7,1%) de infecção prostática, provenientes de 25 pacientes. Do total de pacientes avaliados, dentre os 23 que possuíam ITU, 19 (82,6%) eram da espécie canina e quatro (17,4%) felina. Essas afecções costumam ser mais frequentes em cães do que em gatos (LING, 2004; NELSON; COUTO, 2015; LEOMIL; BURGOS, 2015). O fato da baixa ocorrência de infecções bacterianas em gatos pode ter relação com algumas características fisiológicas desses indivíduos, como seus mecanismos locais de defesa. Dentre eles, a capacidade de produzirem urina altamente concentrada e também por ingerirem dietas ricas em proteínas, a urina é ácida e concentrada em ureia. Logo, com a perda desses mecanismos de defesa há mais predisposição ao desenvolvimento de cistites bacterianas. Sendo, portanto na maioria das vezes observada em gatos senis (LEOMIL; BURGOS, 2015).

Dentre os isolados obtidos, dois foram oriundos de infecção prostática. Em estudo realizado na França, por meio da análise de 418 casos clínicos de suspeita de doença prostática canina, a incidência dessas afecções foi de 0,6%, e os distúrbios mais prevalentes foram hiperplasia prostática benigna (HPB) (45,9%) e prostatite (38,5%) (Polisca et al, 2015). Já em outro estudo, a doença prostática mais comum foi a prostatite bacteriana (KRAWIEC; HEFLIN, 1992). De forma que a *Escherichia coli*

tem sido a bactéria mais comumente isolada nessas prostatites (SMITH, 2008; NELSON; COUTO, 2015; CHRISTENSEN, 2017).

### 3.2 Sensibilidade aos antibióticos

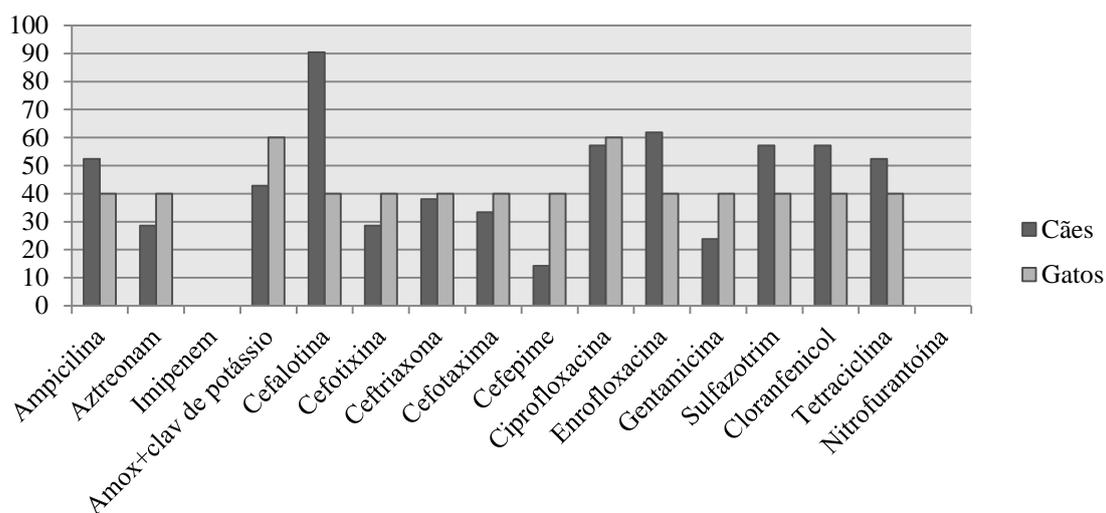
Os antimicrobianos são os fármacos de base para o tratamento de ITU e na maior parte dos casos a escolha do mesmo deve ser baseada no resultado do teste de sensibilidade do patógeno isolado da urina. Contudo, o uso intensivo dessas medicações pode culminar com a seleção de organismos resistentes (OLIN; BARTGES et al., 2015). Os agentes com multirresistência a múltiplos fármacos conferem riscos significativos para saúde humana, medicina veterinária e para a comunidade (OLIN; BARTGES et al., 2015; WALTHER; TEDIN; LUBKE-BECKER, 2017).

Os 21 isolados de *E. coli* do trato urinário de cães demonstraram alta taxa de resistência, 19 (90,40%) isolados resistentes à cefalotina (cefalosporina de primeira geração), seguida pela enrofloxacin com 13 (61,90%) isolados resistentes, de forma que 12 (57,14%) foram resistentes à sulfazotrim, cloranfenicol e ciprofloxacina, onze (52,38%) isolados foram resistentes à ampicilina e na mesma porcentagem foi observada resistência à tetraciclina. E entre os felinos a maior frequência de resistência foi observada aos antibióticos cefalotina e ciprofloxacina, com três (60%) amostras resistentes cada, das cinco avaliadas. Seguido pela resistência de ampicilina, aztreonam, amoxicilina com clavulanato de potássio, cefotixina, ceftriaxona, cefepime, enrofloxacin, gentamicina, sulfazotrim, cloranfenicol e tetraciclina, com duas (40%) amostras cada (Gráfico 1). Estudos (CUMMINGS, APREA, ALTIER, 2015; MARQUES et al., 2018) relatam um aumento da resistência à fluorquinolonas (COHN et al., 2003; HARADA et al., 2010) cada vez mais frequente, assim como cefalosporinas (DAZIO et al., 2021). Na prática clínica, por vezes, essas classes de antimicrobiano são utilizados com frequência em infecções de trato urinário, assim como sulfametoxazol+trimetoprim, que inclusive é recomendado como fármaco de primeira escolha para tratamento de ITU (WEESE et al., 2019).

Todos isolados de ITU de cães, quanto de gatos, foram sensíveis ao imipenem e nitrofurantoína. Da mesma forma que em outros estudos houve sensibilidade total ao imipenem (ASLANTAS; YILMAZ, 2017; HUANG, KUANG, YEH, 2020) e nitrofurantoína (KOGIKA et al., 1995), em diversos estudos com isolados de *E. coli* oriundos de ITU de cães e gatos. O imipenem também mostrou ser um antibiótico mais

eficiente contra cepas de UPEC oriundas de infecções em humanos (TERLIZZI; GRIBAUDO MAFFEI, 2017; RAEISPOUR; RANJBAR, 2018).

**Gráfico 1** – Prevalência de resistência aos antimicrobianos entre os isolados de *E.coli* de ITU em cães e gatos, atendidos, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL), no período de 2015 a 2020.



Foi possível constatar que 14 (66,67%) dos isolados de cães com ITU puderam ser classificadas como resistente à múltiplos fármacos (MDR). Por meio do teste de sinergia de disco duplo foi possível constatar que, em cães, dois (9,52%) isolados foram fenotipicamente identificados como produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) e baseado na sensibilidade as cefamicinas e resistência aos inibidores de  $\beta$ -lactamases, quatro (19,05%) lactamases do tipo AmpC. (Tabela 6a).

**Tabela 6a** – Identificação dos isolados de *E.coli* de ITU, em cães e gatos com relação à resistência antimicrobiana, isolados produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) e  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL), no período de 2015 a 2020.

Isolados	Antibióticos resistentes	$\Sigma$ Atb	AMR	ESBL	AmpC
2	CFL, CIP, ENO, SUT, CLO, TET	5	MDR	-	-
4	AMP, ATM, AMC, CFL, CRO, CPM, CIP, ENO, GEN, SUT, CLO, TET	8	MDR	+	-
6	CFL, CIP, CLO, TET	4	MDR	-	-
7	AMP, AMC, CFL, CFX, CPM, CIP, ENO, SUT, CLO, TET	8	MDR	-	-
8	CFL, CIP, ENO, SUT, CLO, TET	5	MDR	-	-
9a	AMP, ATM, AMC, CFL, CRO, CPM, ENO, GEN, SUT, CLO, TET	8	MDR	+	-
9b	AMP, ATM, AMC, CFL, CFO, CRO, CTX, CIP, ENO, GEN, SUT, CLO, TET	8	MDR	-	+
10	AMP, ATM, AMC, CFL, CFO, CRO, CTX, CIP, ENO, GEN, SUT, CLO, TET	8	MDR	-	+
13	CFL	1	S	-	-
14	CFL	1	S	-	-
15	CFL	1	S	-	-
16	AMP, CFL, CIP, ENO, SUT, CLO	5	MDR	-	-
17	AMP, ENO, SUT	3	MDR	-	-
18	CFL	1	S	-	-
20	-	0	S	-	-
23	CFL,	1	S	-	-
24	AMP, AMC, CFL, CFO, CRO, CTX, CIP, ENO, SUT, CLO, TET	7	MDR	-	+
25	AMP, AMC, CFL, CRO, CIP, ENO, GEN, SUT, CLO, TET	8	MDR	-	-
26	CFL, CFO, CTX	1	S	-	-
27	AMP, ATM, AMC, CFL, CFO, CRO, CTX, CIP, ENO, SUT, CLO, TET	7	MDR	-	-
28	AMP, ATM, AMC, CFL, CFO, CTO, CTX, ENO	4	MDR	-	+

*Legenda:* Atb – Antimicrobianos,  $\Sigma$ Atb – Soma de classes antibióticos resistentes, AMR – Resistência a antimicrobianos, AMP – Ampicilina; ATM – Aztreonam; IPM – Imipenem; AMC – Amoxicilina/ácido clavulânico; CFL – Cefalotina; CFO – Cefoxitina; CRO – Ceftriaxona; CTX – Cefotaxima; CPM – Cefepime; CIP – Ciprofloxacina; ENO – Enrofloxacinina; GEN – Gentamicina; SUT – Sulfazotrim (sulfametoxazol/trimetopim); CLO – Cloranfenicol, TET – Tetraciclina; NIT – Nitrofurantoina, MDR – Resistente à múltiplos fármacos, S – Sensível, +/-positivo ou negativo, de acordo com a característica avaliada.

E em felinos, puderam ser classificados como MDR, dois (40%) isolados. E nenhum dos isolados avaliados foram positivos para a produção de ESBL e nem para lactamases tipo AmpC (Tabela 6b).

**Tabela 6b** – Identificação dos isolados de *E. coli* de ITU, em gatos com relação à resistência antimicrobiana, isolados produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) e  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL), no período de 2015 a 2020.

Isolados	Antibióticos resistentes	$\Sigma$ Atb	AMR	ESBL	AmpC
1a	AMP, ATM, AMC, CFL, CFO, CRO, CTX, CPM, CIP, ENO, GEN, SUT, CLO, TET	8	MDR	-	-
1b	AMP, ATM, AMC, CFL, CFO, CRO, CTX, CPM, CIP, ENO, GEN, SUT, CLO, TET	8	MDR	-	-
12	CFL, CIP	2	S	-	-
19	-	0	S	-	-
21	-	0	S	-	-

*Legenda:* Atb – Antimicrobianos,  $\Sigma$ Atb – Soma de classes antibióticos resistentes, AMR – Resistência a antimicrobianos, AMP – Ampicilina; ATM – Aztreonam; IPM – Imipenem; AMC – Amoxicilina/ácido clavulânico; CFL – Cefalotina; CFO – Cefoxitina; CRO – Ceftriaxona; CTX – Cefotaxima; CPM – Cefepime; CIP – Ciprofloxacina; ENO – Enrofloxacina; GEN – Gentamicina; SUT – Sulfazotrim (sulfametoxazol/trimetopim); CLO – Cloranfenicol, TET – Tetraciclina; NIT – Nitrofurantóina, MDR – Resistente à múltiplos fármacos, S – Sensível, +/-positivo ou negativo, de acordo com a característica avaliada.

Outros estudos realizados verificaram o aumento da resistência antimicrobiana em cães e gatos (HARADA et al., 2010; OSUGUI et al., 2014; MARQUES et al., 2018). Diversos podem ser os fatores relacionados a mais da metade dos isolados em cães e dois de gatos serem MDR, dentre eles, o fato de grande parte dos pacientes em questão terem histórico de tratamento com antimicrobianos sistêmicos precedentes. Outros estudos puderam também constatar que esse é um fator de risco importante para o desenvolvimento de microorganismos multi-resistentes (TUERENA et al., 2016; SAPUTRA et al., 2017; KARKABA et al., 2019; DAZIO et al., 2021). Em estudo realizado por Saputra e colaboradores (2017), houve aumento de seis a oito vezes na probabilidade de desenvolvimento de *E. coli* MDR, em cães e gatos, que possuíam infecção crônica de trato urinário e histórico de tratamento anterior com antimicrobianos.

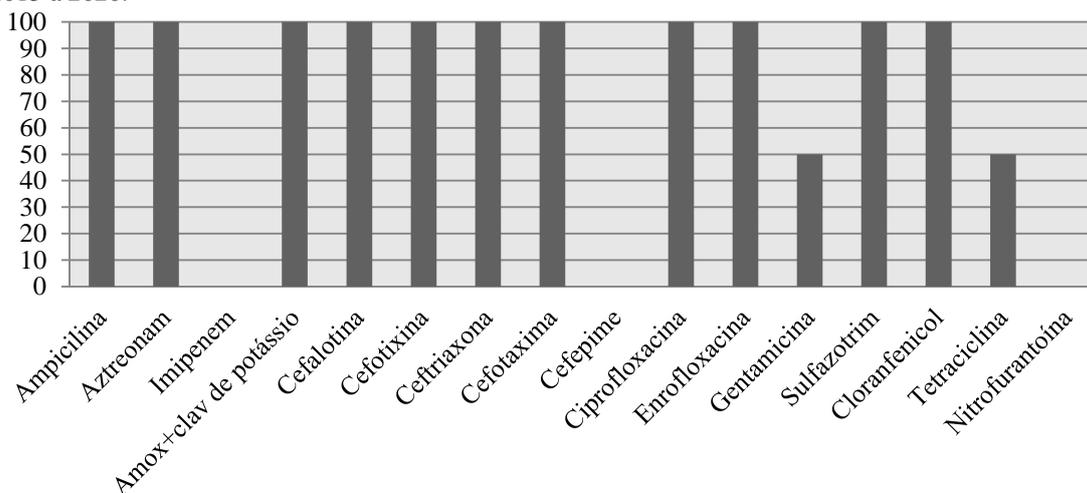
A prevalência global de *E. coli* produtora de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) foi avaliada em 6,87%, em cães e 5,04% em gatos (SALGADO-CAXITO et al., 2021). Em Taiwan, a prevalência de *E. coli* produtora de ESBL em amostras aspiradas principalmente de ITU, piometra e feridas cutâneas, em cães e gatos foi de 24,1% e 18,6% respectivamente (HUAND; KUAN; YEH, 2020). Em outro estudo, além do tratamento anterior com antimicrobiano, outros fatores citados como responsáveis pelo

surgimento de *E. coli* ESBL ou AMPC foram contato frequente com clínicas veterinárias e viagens internacionais (KARKABA et al., 2019).

Em um estudo feito por Toombs-Ruane e colaboradores (2020), por meio da análise do genoma de *E. coli* em 11 domicílios, foi possível identificar a mesma cepa de produtora de ESBL/AmpC entre cães e membros da família com ITU, corroborando com a existência de transmissão entre humanos e animais no ambiente de convívio. Assim como, Ljungquist e colaboradores (2016), em que cepas idênticas de Enterobacteriaceae resistentes às cefalosporinas de espectro estendido puderam ser isoladas de humanos e cães que coabitam ambientes domésticos. Logo, possivelmente há uma transmissão entre humanos e cães e gatos de ExPEC, o que evidencia o risco para saúde pública.

No tratamento de prostatite tem-se preconizado a utilização de fluorquinolonas e sulfazotrim (KHADIDJA; ADEL, 2017). No concerne à resistência dos dois isolados de *E. coli* do líquido prostático, os mesmos foram caracterizados como isolados multirresistentes à diversos fármacos. Foi possível verificar resistência de ambos à ampicilina, aztreonam, amoxicilina com clavulanato de potássio, cefalotina, ceftriaxona, cefotaxima, ciprofloxacina, enrofloxacina, sulfazotrim e cloranfenicol, de forma que gentamicina e tetraciclina foram resistentes apenas a uma das cepas. Já o imipenem, cefepime e nitrofurantoína foram sensíveis nas duas amostras (Gráfico 2).

**Gráfico 2** – Prevalência de resistência antimicrobiana avaliadas os isolados de prostatite por *E.coli*, em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL), no período de 2015 a 2020.



A análise de sensibilidade realizada nas duas amostras de infecção prostática por *E. coli* demonstra que ambas apresentavam resistência à múltiplos fármacos (MDR),

contudo nenhuma das mostras foram fenotipicamente positivas para ESBL e AmpC (Tabela 6c).

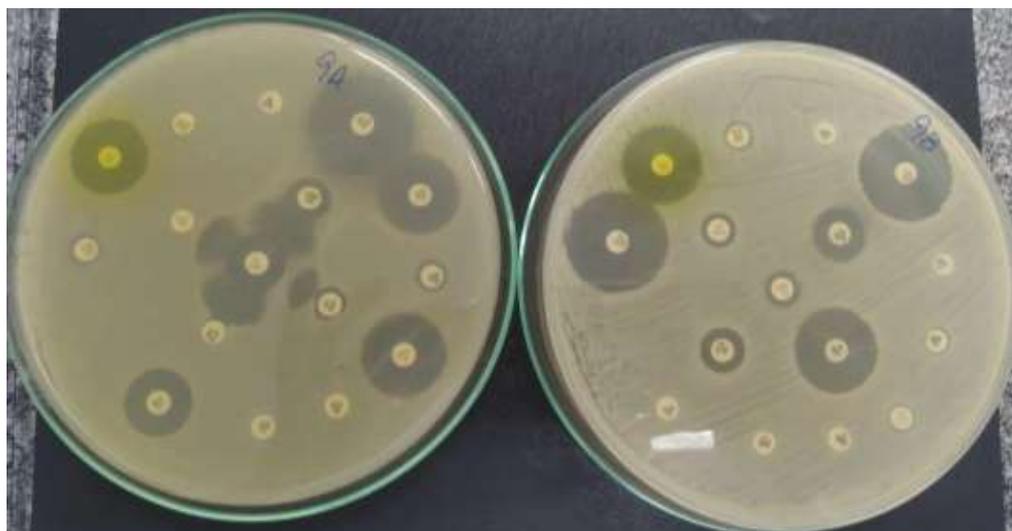
**Tabela 6c** – Identificação dos isolados de *E.coli* de prostatite, de cães, com relação à resistência antimicrobianas, positivos para  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) e  $\beta$ - lactamases do tipo AmpC, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL), no período de 2015 a 2020.

Amostra	Antibióticos resistentes	$\Sigma$ Atb	AMR	ESBL	AmpC
5	AMP, ATM, AMC, CFL, CFO, CRO, CTX, CIP, ENO, SUT, CLO	6	MDR	-	-
11	AMP, ATM, AMC, CFL, CFO, CRO, CTX, CIP, ENO, GEN, SUT, CLO, TET	8	MDR	-	-

*Legenda:* Atb – Antimicrobianos,  $\Sigma$ Atb – Soma de classes de antibióticos resistentes, AMR – Resistência a antimicrobianos, AMP – Ampicilina; ATM – Aztreonam; IPM – Imipenem; AMC – Amoxicilina/ácido clavulânico; CFL – Cefalotina; CFO – Cefoxitina; CRO – Ceftriaxona; CTX – Cefotaxima; CPM – Cefepime; CIP – Ciprofloxacina; ENO – Enrofloxacinina; GEN – Gentamicina; SUT – Sulfazotrim (sulfametoxazol/trimetopim); CLO – Cloranfenicol, TET – Tetraciclina; NIT – Nitrofurantóina, MDR – Resistente à múltiplos fármacos, S – Sensível, +/-positivo ou negativo, de acordo com a característica avaliada.

O fato desses antibióticos terem sido verificados como resistentes a esses isolados de *E. coli* tanto em cães como em gatos pode estar relacionado à utilização em demasia de tais fármacos, causando o desenvolvimento de resistência bacteriana (COHN et al., 2003; GUARDABASSI; SCHWAZ, LLOYD, 2004) (Figura 1).

**Figura 1** – Teste de sensibilidade antimicrobiana em placas de ágar Mueller-Hinton, em que se é possível identificar fenotipicamente uma cepa ESBL (placa à esquerda), pelo teste de disco combinado, por meio da distorção do halo ao redor do disco  $\beta$ -lactâmico (amoxicilina com clavulanato de potássio) (centro da placa (➔)). E outra cepa multirresistente (MDR) (à direita), reconhecidas, em testes precedentes, como *Escherichia coli* urinária (UPEC), ambas de um mesmo portador canino.



Fonte: SOARES, M. T.

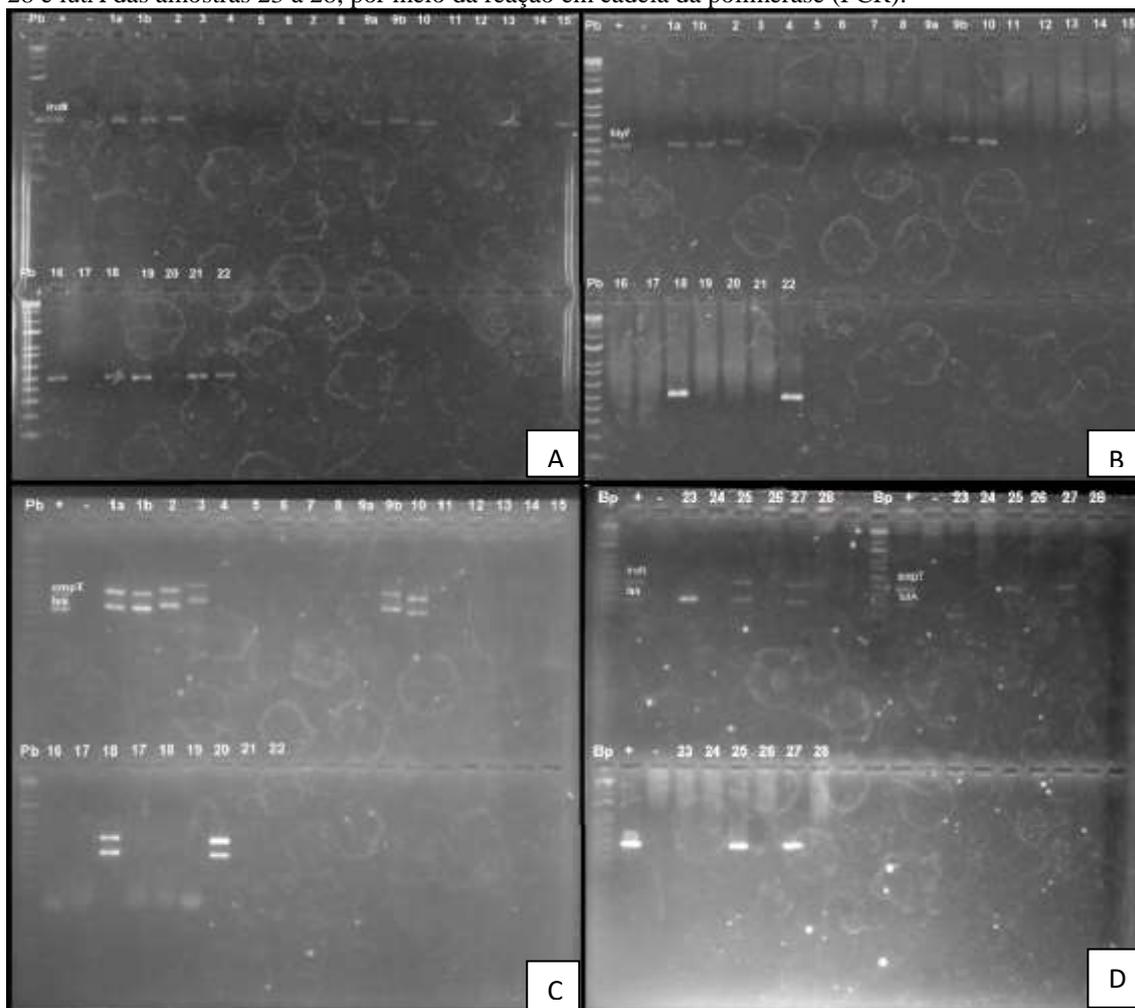
Em humanos, há evidência de que o tratamento de ITU não complicada apenas com a utilização de analgésicos pode ser tão eficaz quanto o uso de antibióticos (GÁGYOR et al., 2015; BLEIDORN et al., 2016). Diante dessa observação é importante que haja iniciativas maiores por parte de veterinários e demais profissionais da saúde para que seja realizado antibiograma com maior frequência. Dessa forma, avaliando a real necessidade de utilização de antimicrobianos.

### **3.3 Fatores de virulência, ilhas de patogenicidade e classificação filogenética**

O desenvolvimento de ITU depende de diversos fatores e sofrem influência da interação entre a virulência bacteriana e também as defesas do organismo (LEOMIL; BURGOS, 2015; DORSCH; TEICHHMANN-KNORRN; LUND, 2019). As defesas do organismo podem estar comprometidas frente às comorbidades, como as citadas anteriormente. Contudo, a interação da bactéria e sua permanência no hospedeiro tem um papel de grande importância no desenvolvimento da infecção.

A caracterização genotípica dos isolados demonstrou que nem todas as amostras apresentavam genes que codificam os fatores de virulência avaliados. Das 21 amostras de infecção urinária por *E. coli* em cães, 16 (76,19%) possuía ao menos um dos genes de virulência avaliados. Já das cinco amostras de felinos avaliadas, quatro (80%) apresentaram ao menos um dos genes que codifica fatores de virulência (Figura 2).

**Figura 2** – Gel de agarose demonstrando os genes de virulência *IroN*, *hlyF*, *ompT* e *Iss* das amostras 1a à 28 e *iutA* das amostras 23 à 28, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).



**Legenda:** 2. Identificação de genes de virulência por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), em gel de agarose. Pb – padrão de peso molecular; (+) – controle positivo para o gene avaliado em questão; (-) – água, como controle negativo. A) Identificação do gene *IroN* nas amostras de 1a à 22. B) Identificação do gene *hlyF* nas amostras de 1a à 22. C) Identificação dos genes *ompT*, *Iss* das amostras de 1 à 22. D) Identificação dos genes *iroN*, *Iss*, *ompT*, *iutA* e *hlyF* das amostras 23 à 28.

Os genes de aderência são indispensáveis para o estabelecimento das infecções. E neste estudo avaliamos a presença da proteína de membrana externa (*Omps*) entre os isolados avaliados. De tal modo que, entre as cepas de UPEC de cães avaliadas, 23,80% possuíam o gene que expressa essa proteína, e felinos, em 40% dos isolados foi possível observar. Similarmente aos dados de cães, outros estudos em humanos, encontraram a frequência de expressão de *OmpT* de aproximadamente 20% (CYOIA et al., 2015; DAGA et al., 2019).

O ferro tem importância significativa para a vida de grande parte dos organismos. Sendo que a disponibilidade desse substrato é indispensável para que as bactérias patogênicas sejam capazes de manterem reações enzimáticas e possibilitar sua persistência em infecções. Logo, os sideróforos são fatores de virulência essenciais na

obtenção desse substrato que viabiliza a sobrevivência de uropatógenos (WILSON et al., 2017). Por meio das análises feitas no presente estudo foi possível verificar a maior prevalência entre os genes de virulência avaliados, do sideróforo yersiniabactina (*FyuA*), tanto em cães (46,61%), quanto em gatos (80%). Assim como em diversos outros estudos, em veterinária (JOHNSON et al., 2003; OSUGUI et al., 2014; JOHNSON et al., 2017) e medicina humana (JOHNSON; STELL, 2000; CYOIA et al., 2015; KARAM et al., 2018; DAGA et al., 2019).

Outros sistemas de aquisição de ferro, identificado pelo gene *iron* e *iutA*, foram os próximos genes mais prevalentes entre as amostras de cães, com a frequência de 46,61% e 38,09% respectivamente. De modo que o *iron* se apresentou na mesma frequência do *FyuA* entre os isolados de gatos (80%), bem como o *iutA* esteve presente em 40%. A maior prevalência desses genes que representam sistemas de aquisição de ferro reforça a premissa de que os mesmos estão em predomínio entre as ExPEC, conjuntamente com os genes de adesão (LIU; THUNGRAT; BOOTHE, 2015).

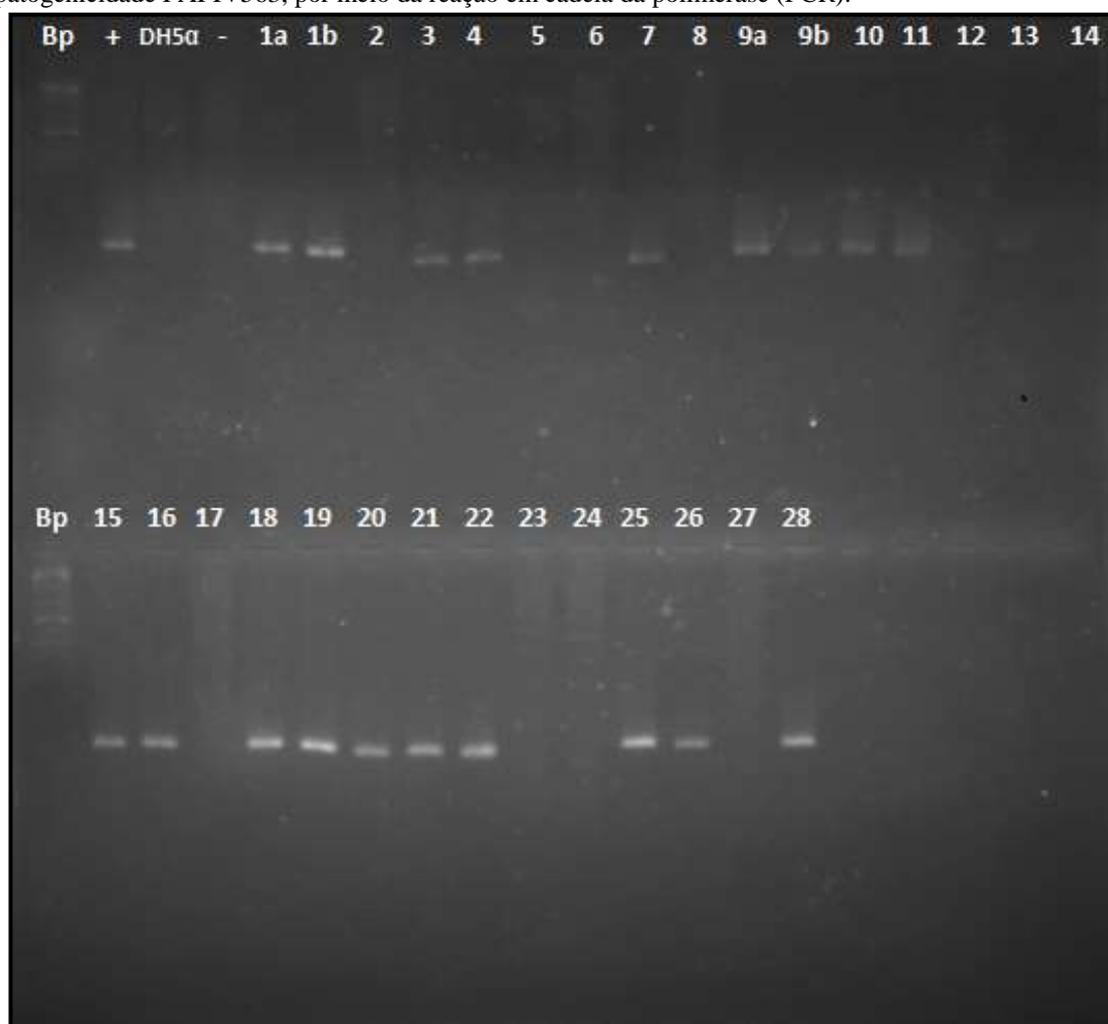
Alguns estudos anteriores, em humanos, relataram haver relação entre a presença dos genes *iutA* e *fyuA* e os genes produtores de ESBL em *E. coli* (ABDELMEGEED; BARWA; EL GALIL et al., 2015; LILLO et al., 2014). No presente estudo não foi verificada essa relação, visto o reduzido número de cepas identificadas como produtoras de ESBL, contudo esse dado deve ser mais explorado em estudos posteriores, visto a grande importância e prevalência desses genes entre os isolados de UPEC.

Dos genes de virulência, os que foram testados relacionados à produção de toxinas e hemolisina incluíram *hlyA* e *hlyF*. Entre os isolados de ITU de cães, *hlyF* esteve presente na frequência de 19,04% e de 40% entre os de gatos. De maneira similar aos isolados de cães, esse gene foi isolado em 20,8% de amostras isoladas de infecções da corrente sanguínea por *E. coli* (DAGA et al., 2019), e em 19,8% dos isolados de EXPEC, ambos de humanos. Já o gene  $\alpha$ -haemolisina (*hlyA*) não foi detectado em nenhum dos isolados de ITU tanto em cães quanto em gatos, sendo que em estudos em humanos variou entre os valores de 1,9% (LÓPEZ-BANDA et al., 2014), 14,6% (DAGA et al., 2019) e 18,75% (CYOIA et al., 2015).

Já o gene *Iss*, responsável pela proteína associada à resistência do soro (JOHNSON et al., 2008), foi detectado em 28,57% dos isolados de cães, e em 40% de gatos, com ITU. Prevalência semelhante à dos cães foi observada em estudo de ExPEC humana, com frequência de 20% (CYOIA et al., 2015).

As PAI's mais prevalente entre os isolados de cães foram PAI IV 536, PAI ICFT073 e PAI II536, todas com a frequência de 23,81% cada entre os isolados de ITU e 19,04% de PAI I536. E entre os isolados de felinos, a mais frequente foi a PAI IV 536 (80%), seguida pelas IICFT073 (40%) e PAI I536 e PAI II536, ambas com 20% de frequência. Entre isolados de cães e gatos, o gene PAI IJ36 foi o menos incidente, com um isolado positivo para cães e nenhum para gatos (Figura 3). Os dados apoiam estudos precedentes, que também demonstraram alta prevalência do marcador PAI IV 536 (SABATÉ et al., 2006; MIDDENDORF et al., 2004; CYOIA et al., 2015; DAGA et al., 2019) e baixa prevalência de PAI I536 e PAI IJ96 (SABATÉ et al., 2006).

**Figura 3** – Gel de agarose demonstrando o gene *Irp2*, responsável pela expressão da ilha de patogenicidade PAI IV563, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).



*Legenda:* Bp – padrão de peso molecular; (+) – controle positivo para o gene avaliado (*Irp2*) em questão; DH5α – cepa de controle negativo; (-) – água, como controle negativo.

De acordo com a classificação filogenética o grupo de maior incidência avaliado neste trabalho foi o B2, tanto em isolados de cães (42,85%), quando de gatos (60%). O grupo desconhecido, com a frequência de cinco (23,09%), foi o segundo mais prevalente nos isolados de cães com ITU. Assim também identificado em gatos, com 40% dos isolados classificados no grupo desconhecido, também apresentando essa mesma frequência o grupo F. Como já comprovado na literatura, o grupo B2 é responsável por representar a maioria das cepas de *E. coli* UPEC, em cães e gatos (JOHNSON et al., 2003; OSUGUI et al, 2014; HARADA et al., 2010; LIU; THUNGRAT; BOOTHE, 2015; HUTTON et al., 2017). E também em humanos, no entanto, havendo apenas divergência com relação aos outros grupos mais prevalentes depois do B2, sendo ele o grupo D (LÓPEZ- BANDA et al, 2004; RAHDAR et al., 2015; JOHNSON et al., 2017; HUTTON et al., 2017). A distribuição dos genes de virulência, ilhas de patogenicidade e classificação filogenética de acordo com os isolados de *E.coli* de ITU avaliados podem ser verificados na Tabela 7.

**Tabela 7-** Classificação das amostras de infecção urinária por *E. coli* em cães e gatos, com relação aos genes de virulência e ilhas de patogenicidade e classificação filogenética.

Espécie	Isolados	Genes de virulência	Ilhas de patogenicidade	Classificação filogenética
Canina	2	<i>IroN, ompT, Iss, iutA</i>	-	Desconhecido
	4	<i>iutA, FyuA</i>	PAI IV536	B2
	6	-	-	Desconhecido
	7	<i>FyuA</i>	PAI IV536	E ou clad I
	8	-	-	Desconhecido
	9a	<i>IroN, FyuA</i>	PAI IV536, PAI IICFT073, PAI II536	B2
	9b	<i>IroN, ompT, hlyF, Iss, iutA, FyuA</i>	PAI IV 536	Clad I ou II
	10	<i>IroN, iutA, FyuA</i>	PAI IV536	A ou C
	13	<i>IroN, FyuA</i>	PAI IV536, PAI IICFT073, PAI I536, PAI II536	B2
	14	-	-	A ou C
	15	<i>IroN, FyuA</i>	PAI IV536, PAI I536, PAI II536, PAI IJ36	B2
	16	<i>IroN, FyuA</i>	PAI IV536, PAI I536, PAI II536, PAI IJ36	B2
	17	-	PAI IICFT073	B2
	18	<i>IroN, hlyF, iutA, FyuA</i>	PAI IV536, PAI IICFT073	B2
	20	<i>ompT, Iss, FyuA</i>	PAI IV536	E ou clad I
	23	<i>Iss,</i>	-	E ou clad I
	24	-	-	Desconhecido
	25	<i>IroN, ompT, hlyF, Iss, iutA, FyuA</i>	PAI IV536	A ou C
	26	<i>FyuA</i>	PAI IV536	B2
	27	<i>IroN, ompT, hlyF, Iss, iutA</i>	-	Desconhecido
	28	<i>FyuA</i>	PAI IV536, PAI IICFT073, PAI I536, PAI II536	B2
Felina	1a	<i>IroN, ompT, hlyF, Iss, iutA, FyuA</i>	PAI IV536	B2
	1b	<i>IroN, ompT, hlyF, Iss, iutA, FyuA</i>	PAI IV536	F
	12	-	-	Desconhecido
	19	<i>IroN, FyuA</i>	PAI IV536, PAI IICFT073, PAI I536, PAI II536	B2
	21	<i>IroN, FyuA</i>	PAI IV536, PAI IICFT073	B2

Entre os 21 isolados de ITU por *E. coli* em cães, 76,19% possuíam ao menos um dos genes de virulência e ilhas de patogenicidade avaliados. Sendo que dos nove isolados classificados no grupo B2, oito (88,90%) tinham ao menos um fator de

virulência presente e todos possuíam ao menos uma ilha de patogenicidade. Além disso, foi possível constatar que a maioria (66,70%) dos isolados de cães, inclusos no grupo B2 foram classificadas como sensíveis no teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Da mesma maneira, as amostras de ITU por *E. coli* de gatos, classificadas no grupo B2, possuíam ao menos dois fatores de virulência e uma ilha de patogenicidade. E assim como observado em cães, a maioria (66,7%) das amostras de gatos identificadas no grupo B2, mostraram-se sensíveis a maior parte dos antibióticos testados. Osugui e colaboradores (2014), em estudo similar ao presente relatado, também constatou por meio da avaliação de ExPEC de cães e gatos que as amostras MDR foram identificadas, em sua maioria, em grupos distintos ao grupo B2. Assim como observado em outros estudos, em humanos (JOHNSON; STELL, 2000; DAGA et al., 2019). Tal como observado em estudo em gatos com UPEC nos Estados Unidos, em que 84,6% das amostras contidas no grupo B2 eram sensíveis (LIU; THUNGRAT; BOOTHE, 2015). E igualmente em cães, em que 67% dos isolados B2 demonstraram ser sensíveis (WAGNER; GALLY; ARGYLE, 2014).

Com avaliação dos dados de ITU por *E. coli*, em cães e gatos do presente estudo, à princípio não houve identificação da relação entre a presença de genes de virulência e multirresistência, visto que essa característica esteve presente tanto em isolados multirresistentes quanto sensíveis aos antimicrobianos. Entretanto, entre os isolados resistentes notou-se uma maior variedade dos genes de virulência pesquisados. De tal modo que, em 41,70% dos isolados resistentes de cães verificou-se a presença de mais de três fatores de virulência, enquanto nos isolados sensíveis apenas 22,22% apresentavam mais que três fatores de virulência. Da mesma forma, em felinos, entre as resistentes todas possuíam mais do que três fatores de virulência, e dos isolados sensíveis apenas 33,33% tinham essa diversidade de característica. Na Medicina Humana (SHAH et al., 2019; KARAM; HABIBI; BOUZARI, 2018) e também na veterinária (OSUGUI et al., 2014), observaram uma prevalência maior de MDR em UPEC virulentas. E este achado possivelmente tenha relação com a presença conjunta de genes de resistência e fatores de virulência em elementos transferíveis de resistência, como plasmídeos e integrons (KOCZURA et al., 2012).

Houve também uma diversidade maior de ilhas de patogenicidade, todavia, entre os isolados sensíveis, pois em cães, 33,33% dos isolados sensíveis tinham mais do que três ilhas de patogenicidade, sendo de 16,66% essa frequência de ilhas entre os isolados resistentes. E em felinos, somente entre as cepas sensíveis foi possível verificar a

frequência de 33,33%, de mais do que três PAI's caracterizadas. Este fenômeno pode estar relacionado com o fato de que muitos fatores de virulência estão presentes em PAI's, e alguns estudos relataram que a aquisição de resistência a determinados antimicrobianos podem causar a perda em regiões do cromossomo onde estão presentes essas ilhas de patogenicidade (CEPAS; SOTO, 2020).

Dentre os demais genes de virulência avaliados, pode-se inferir sobre uma relação observada entre o *iutA* e a resistência a múltiplos antimicrobianos, pois dos nove isolados de cães com ITU reagentes para tal gene, sete (77,8%) eram multirresistentes. Assim como, dos cinco isolados de gatos, os dois multirresistentes foram positivos para a presença do gene *iutA*, enquanto os três sensíveis não possuíam o mesmo. A constatação dessa frequência mais alta desse gene em amostras MDR já foi descrita em estudo precedente (LIU; THUNGRAT; BOOTHE, 2015)

Os dois isolados de prostatite possuíam filogrupos distintos ao encontrado na maioria das amostras de infecção de trato urinário em cães e gatos, sendo eles, o desconhecido em uma das amostras e A ou C em outra. Sendo que apenas um gene de virulência (*iutA*) e uma ilha de patogenicidade (PAI IV536) foram identificadas nas amostras pertencentes ao grupo A ou C, não sendo identificada nenhuma dessas característica no outro isolado (Tabela 8).

**Tabela 8** - Classificação filogenética das amostras de infecção prostática por *E. coli* em cães.

Amostras	Genes de virulência	Ilhas de patogenicidade	Classificação filogenética
5	-	-	Desconhecido
11	<i>iutA</i>	PAI IV536	A ou C

Hutton e colaboradores (2017), em sua análise, avaliaram três amostras de prostatite e também não encontraram associação a nenhum gene de virulência, contudo, assim como nosso estudo, a avaliação foi feita com um número amostral muito restrito. Em humanos, houve a verificação de uma associação à alguns genes de virulência, como hemolisina, *cnf1* e fímbrias P (ANDREU et al., 1997). Assim como estudo, que constatou que isolados de *E. coli* de prostatite exibiram mais fatores de virulência que os isolados de cistite, sugerindo que amostras isoladas do trato urinário possam ser menos virulentas do que aquelas que migram para a próstata. No entanto, não houve variação significativa entre os grupos filogenéticos entre amostras de cistite e prostatite (JOHNSON et al., 2005).

## 5 CONCLUSÃO

As cepas de EXPEC de cães e gatos, assim como as cepas de *E. coli* de prostatite avaliadas apresentaram semelhanças filogenéticas com isolados de humanos, além de altas porcentagens de resistência aos antimicrobianos. Este dado reforça a evidência do risco de disseminação de cepas multirresistentes entre humanos e animais, e isso representa um risco significativo para a saúde pública, ainda mais por grande parte delas serem cepas multirresistentes.

E mesmo que o número de amostras avaliadas não tenha sido expressivo, este estudo fornece informações úteis e importante sobre a distribuição filogenética, identificação fenotípica de ESBL e AmpC em UPEC.

Este estudo reforça a necessidade de monitoramento das taxas de resistência antimicrobiana locais, pois por meio deste dado podemos orientar as práticas de uso dessa classe de fármacos. E também o estudo da virulência e resistência aos antibióticos às diversas cepas de *Escherichia coli*, desde comensais até patogênicas (intestinais e extra-intestinais), é de capital importância no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Sendo que o conhecimento sobre a correlação entre fatores de virulência e a multirresistência poderia auxiliar na compreensão de pacientes com infecção do trato urinário, reduzindo o uso impróprio de antibióticos.

## REFERÊNCIAS

ABDELMEGEED, E. S.; BARWA, R.; EL GALIL, K. H. A. Comparative study on prevalence and association of some virulence factors with extended spectrum beta-lactamases and AmpC producing *Escherichia coli*. **African Journal of Microbiology Research**. v. 9, n. 17, p. 1165-1174, 2015.

ANDREU, A.; STAPLETON, A. E.; FENNELL, C.; LOCKMAN, H. A.; XERCAVINS, F.; FERNANDEZ, F.; STAMM, W. E. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* Strains Causing Prostatitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 2, p. 464- 469, 1997.

BARTGES, J. W. Diagnosis of urinary tract infections. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**. v. 34, n. 4, p. 923-933, 2004.

BÉLANGER, L.; GARENAUX, A.; HAREL, J.; BOULIANNE, M.; NADEAU, E.; DOZOIS, C. M. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E.coli*. **FEMS Immunology & Microbiology**. v. 62, n. 1, p. 10-11, 2011.

BIELECKI, P.; MUTHUKUMARASAMY, U.; ECKWEILER, D.; BIELECKA, A.; POHL, S.; SCHANZ, A.; NIEMEYER, U.; OUMERACI, T.; VON NEUHOFF, N.; GHIGO, J-M. HAUSSLER, S. In vivo mRNA profiling of uropathogenic *Escherichia coli* from diverse phylogroups reveals common and group-specific gene expression profiles. **mBio**. v. 5, n. 4, p. 1-12, 2014. <<https://doi.org/10.1128/mBio.01075-14>>

BOURNE, J. A.; CHONG, W. L.; GORDON, D. M. Genetic structure, antimicrobial resistance and frequency of human associated *Escherichia coli* sequence types among faecal isolates from healthy dogs and cats living in Canberra, Australia. **PLOS ONE**, v. 14, n.3, p. 1-13, 2019. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212867>>

BYRON, J. K. Urinary Tract Infection. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**. v. 49, n. 2, p. 211-221, 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.11.005>>

CYOIA, P. S.; RODRIGUES, G. R.; NISHIO, E. K.; MEDEIROS, L. P.; KOGA, V. L.; PEREIRA, A. P. D.; VESPERO, E. C.; HOULE, S.; DOZOIS, C. M.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. T. Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil. **Journal of infection in developing countries**. v. 9, n. 10, p. 1068 -1075, 2015. <<https://doi.org/10.3855/jidc.6683>>

CEPAS, V.; SOTO, S. M. Relationship between Virulence and Resistance among Gram-Negative **Bacteria**. **Antibiotics**. v. 9, n. 10, p. 1-11, 2020. <<https://doi.org/10.3390/antibiotics9100719>>

CUMMINGS, K. J. ; APREA, V. A.; ALTIER,C. Antimicrobial resistance trends among canine *Escherichia coli* isolates obtained from clinical samples in the northeastern USA, 2004-2011. **Canadian Veterinary Journal**. v. 56, n. 4, p. 393-398, 2015. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4357913/>>

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P.; SCHENCK, P. A. Canine and feline nephrology and urology. In:\_\_\_\_\_. Chapter 8: Cystitis and Urethritis: **Urinary Tract Infecion**. 2<sup>a</sup> ed. Saint Louis: Elsevier Saunders, 2011, p. 240- 271.

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, n. 1, p. 58-65, 2013. < <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>>

COHN, L. A.; GARY, A. T.; FALES, W. H.; MADSEN, R. W. Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tract. **Journal veterinary diagnostic investigation**. v. 15, n. 2, p. 338-343, 2003. < <https://doi.org/10.1177/104063870301500406>>

DAGA, A. P.; KOGA, V. L.; SONCINI, J. G. M.; MATOS, C. M.; PERUGINI, M. R. E.; PELISSON, M.; KOBAYASHI, R. K.T.; VESPERO, E. C. *Escherichia coli* Bloodstream Infections in Patients at a University Hospital: Virulence Factors and Clinical Characteristics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v.9, n. 191, p.1-10, 2019 <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00191>>

DALE, A. P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (EXPEC): Disease, carriage and clones. **The Journal of Infection**, v. 71, n. 6, p. 615-626, 2015. <<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.09.009>>

DAZIO, V.; NIGG, A.; SCHMIDT, J. S.; BRILHANTE, M.; MAURI, N.; KUSTER, S. P.; BRAWAND, S. G.; SCHUPBACH-REGULA, G.; WILLI, B.; ENDIMIANI, A.; PERRETEN, V.; SCHULLER, S. Acquisition and carriage of multidrug-resistant organisms in dogs and cats presented to small animal practices and clinics in Switzerland. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 35, n.2, p. 970-979, 2021. <<https://doi.org/10.1111/jvim.16038>>

DORSCH, R.; TEICHMANN-KNORRN, S.; LUND, H. S. Urinary tract infection and subclinical bacteriuria in cats: A clinical update. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 21, n.11, p. 1023-1038, 2019. <<https://doi.org/10.1177/1098612X19880435>>

EJRNAES, K.; STEGGER, M.; REISNER, A.; FERRY, S.; MONSEN, T.; HOLM, S. E.; LUNDGREN, B.; FRIMONT-MOLLER, N. Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections: phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. **Virulence**. v. 2, n.6, p. 528-537, 2011. <<https://doi.org/10.4161/viru.2.6.18189>>

FERREIRA, M. C.; NOBRE, D.; OLIVEIRA, M. G. X.; OLIVEIRA, M. C. V.; CUNHA, M. P. V.; MENÃO, M. C.; DELLOVA, D. C. A.; KNOBL, T. Agentes bacterianos isolados de cães e gatos com infecção urinária: perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. **ATAS DE SAÚDE AMBIENTAL – ASA**. v. 2, n.2, p. 29-37, 2014. <<http://www.revistaseletronicas.fmu.br/index.php/ASA/article/view/477/637>>

FRANCO, A.S. **Infecção do trato urinário por *Escherichia coli* em cães e gatos: mecanismos moleculares de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos**. 2017. 105 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2017.

HUANG, Y-H.; KUAN, N-L.; YEH, K-S. Characteristics of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing *Escherichia coli* From Dog and Cats Admitted to a Veterinary Teaching Hospital in Taipei, Taiwan From 2014 to 2017. **Frontiers in Veterinary Science**. v. 7, n. 395, p. 1-9, 2020. <<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00395>>

HUGONNARD, M.; CHALVET-MONFRAY, K.; POUZOT-NEVORET, C.; BARTHÉLÉMY, A.; VIALARD, J.; GOY-THOLLOT, I. Occurrence of bacteriuria in 18 catheterised cats with obstructive lower urinary tract disease: a pilot study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.15, n. 10, p. 843-848, 2013. <<https://doi.org/10.1177/1098612X13477414>>

HUTTON, T. A.; INNES, G. K.; HAREL, J.; GARNEAU, P.; CUCCHIARA, A.; SCHIFFERLI, D. M.; RANKIN, S. C. Phylogroup and virulence gene association with clinical characteristics of *Escherichia coli* urinary tract infections from dogs and cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 30, n. 18, p. 64-70, 2017. <<https://doi.org/10.1177/1040638717729395>>

JOHNSON, J. R.; STELL, A. 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, n.1, 261-272, 2000. <<https://doi.org/10.1086/315217>>

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L.; DELAVARI, P.; MURRAY, A. D.; KUSKOWSKI, M.; GAASTRA, W. Phylogenetic and Pathotypic Similarities between *Escherichia coli* Isolates from Urinary Tract Infections in Dogs and Extraintestinal Infections in Humans. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 183, n. 6, pag. 897-906, 2001. <<https://doi.org/10.1086/319263>>

JOHNSON, J. R.; KASTER, N.; KUSKOWSKI, M. A.; LING, G. V. Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E.coli* isolates from dogs with urinary tract infectio. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 1, p. 337-345, 2003. <<https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.337-345.2003>>

JOHNSON, J. R.; KUSKOWSKI, M. A.; GAJEWSKI, A.; SOTO, S.; HORCAJADA, J. P.; ANTA, T. J.; VILA, J. Extended Virulence Genotypes and Phylogenetic Background of *Escherichia coli* Isolates from Patients with Cystitis, Pyelonephritis, or Prostatitis. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 191, n. 1, p. 46-50, 2005. <<https://doi.org/10.1086/426450>>

JOHNSON, T. J.; WANNENUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, S. J.; ROSENBERGER, S. C.; NOLAN, L.K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**. v.46, n.12, p. 3987-3996, 2008. <<https://doi.org/10.1128/JCM.00816-08>>

JOHNSON, J. R.; JOHNSTON, B. D.; DELAVARI, P.; THURAS, P.; CLABOTS, C.; SADOWSKY, M. J. Phylogenetic Backgrounds and Virulence -Associated Traits of *Escherichia coli* Isolates from Surface Waters and Diverse Animals in Minnesota and Wisconsin. **American Society for Microbiology**. v. 83, n. 24, p.1 - 10, 2017. <<https://doi.org/10.1128/AEM.01329-17>>

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, p. 123-140, 2004. <<https://www.nature.com/articles/nrmicro818>>

KARAM, M. R. A.; HABIBI, M.; BOUZARI, S. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against uropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Immunology**, v. 108, p. 56-67, 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.007>>

KARAM, M. R. A.; HABIBI, M.; BOUZARI, S. Relationships between Virulence Factors and Antimicrobial Resistance among *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections and Commensal Isolates in Tehran, Ira. **Osong Public Health and Research Perspectives**. v.9, n.5, paginas 217-224, 2018. <<https://doi.org/10.24171/j.phrp.2018.9.5.02>>

KARKABA, A.; HILL, K.; BENSCHOP, J.; PLEYDELL, E.; GRINBERG, A. 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. < <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.015>>

KHADIDJA, M.; ADEL, A. Canine Prostatic Disorders. **Veterinary Medicine Open Journal**. v.2, n. 3, p. 83-90, 2017. < <https://doi.org/10.17140/VMOJ-2-120>>

KOCZURA, T.; MOKRACKA, J.; BRACZAK, A.; KRYSIAK, N.; KAZNOWSKI, A. Association between the Presence of Class 1 Integrons, Virulence Genes, and Phylogenetic Groups of Escherichia coli Isolates from River Water. **Microbial Ecology**. v. 65, n. 1, p. 84-90, 2012. < <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0101-3>>

KOGIKA, M. M.; FORUNATO, A. B.; MAMIZUKA, E. M.; HAGIWARA, M. K.; PAVAN, M. F. B.; GROSSO, S. N. A. Etiology study of urinary tract infection in dog. Brazilian **Journal of Veterinary Research and Animals**. v. 32, n. 1, p. 31-36, 1995. < <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.1994.52087>>

KLINGEBERG, A.; NOLL, I.; WILLRICH, N.; FEIG, M.; EMRICH, D.; ZILL, E.; KRENZ-WEINREICH, A.; KALKA-MOLL, W.; OBERDORFER, K.; SCHMIEMANN, G.; ECKMANN, T. Antibiotic-Resistant E.coli in Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection. **Deutsches Arzteblatt International**. v. 115, n. 29-39, p. 494-500, 2018. < <https://doi.org/0.3238/arztebl.2018.0494>>

KRAWIEC, D. R.; HEFLIN, D. Study of prostatic disease in the dogs: 177 cases (1981-1986). *Journal American Veterinary Medicine Association*. v. 200, n. 8, p. 1119-1122, 1992. <PMID: 1376729>

LEES, G. E.; OSBORNE, C. A.; STEVENS, J.B.; WARD, G. E. Adverse effects of open indwelling urethral catheterization in clinically normal male cats. *American journal veterinary research*. v. 42, n. 5, p. 825-833, 1981. < PMID: 7258801>

LEITÃO, J. H. Microbial Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 21, n.15, p. 1-6, 2020. <<https://doi.org/10.3390/ijms21155320>>

LEOMIL, L.; BURGOS, Y. K. Escherichia coli e Salmonella. In: JERICÓ, M. M.; NETO, J. P. A.. KOGIKA, M. M. **Trato de Medicina Interna de cães e gatos**. Local: ROCA, 2015, p. 2615-2633.

LEWIS, A. J; RICHARD, A. C.; MULVEY, M. A. Invasion of Host Cells and Tissues by Uropathogenic Bacteria. **Microbiology Spectrum**. n. 4, v. 6, p. 1-29, 2016. < <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0026-2016>>

LING, G. V.; NORRIS, C. R.; FRANTI, C. E.; EISELE, P. H.; JOHNSON, D. L. RUBY, A. L.; JANG, S. S. Interrelations of organism prevalence, specimen collection method, and host age, sex, and breed among 8354 canine urinary tract infections (1969-1995). **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 15, n. 4, p. 341-347, 2001. < PMID: 11467591>

LILLO, J.; PAI, K.; BALODE A.; MAKAROVA, M.; HUIK, K.; KOLJALG, S.; IVANOVA, M.; KAFTYREVA, L; MICIULEVICIENE, J.; NAABER, P.; PARV, K.; PAVELKOVICH, A.; ROOP, T.; TOOMPERE, K.; SUZHAEVA, L.; SEPP, E. Differences in Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Escherichia coli

Virulence Factor Genes in the Baltic Sea Region. **BioMed Research International**. 2014 <<https://doi.org/10.1155/2014/427254>>

LING, G. V. Infecções bacterianas do trato urinário. In: Ettinger S. J., Feldman E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 5ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.1768-1776.

LIU, X. ; THUNGRAT, K.; BOOTHE, D. M. Multilocus Sequence Typing and Virulence Profiles in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Cats in the United States. **PLOS ONE**. v. 10, n. 11, p. 1-14, 2015. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.01043335>>

LJUNGQUIST, O.; LJUNGQUIST, D.; MYRENAS, M.; RYDÉN, C.; FINN, M.; BENGTTSSON, B. Evidence of household transfer of ESBL-/pAmpC-producing Enterobacteriaceae between humans and dogs – a pilot study. **Infection ecology and Epidemiology – The one health journal**. v. 6, p. 1 – 7, 2016. <<https://doi.org/10.3402/iee.v6.31514>>

LOPES, M. D.; VOLPATO, R. Principais Doenças do Trato Reprodutivo de Cães. In: JERICÓ, M. M.; NETO, J. P. A.. KOGIKA, M. M. **Trato de Medicina Interna de cães e gatos**. Local: ROCA, 2015, p. 4765 – 4807

LÓPEZ – BANDA, D. A.; CARRILLO-CASAS, E. M.; LEYVA-LEYVA, M.; OROZCO-HOYUELA, G.; MANJARREZ-HERNÁNDEZ, A. H.; ARROYO-ESCALANTE, S.; MONCADA-BARRÓN, D.; VILLANUEVA-RECILLAS, S.; XICOHTENCATH-CORTES, J.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R. Identification of Virulence Factors Genes in *Escherichia coli* Isolates from Women with Tract Infection in Mexico. **BioMed Research International**. p. 1 – 10, 2014. <<https://doi.org/10.1155/2014/959206>>

LUO, Y.; MA, Y.; ZHAO, Q.; WANG, L.; GUO, L.; YE, L.; ZHANG, Y.; YAN, J. Similarity and divergence of phylogenies, antimicrobial susceptibilities, and virulence factor profiles of *Escherichia coli* isolates causing recurrent urinary tract infections that persist or result from reinfection. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n.12, p. 4002 – 4007, 2012. <<https://doi.org/10.1128/JCM.02086-12>>

LUTHJE, P.; BRAUNER, A. Virulence factors of uropathogenic *E.coli* and their interaction with the host. **Advances in Microbial Physiology**. v. 65, p.337-372, 2014. <<https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.006>>

MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 152, n. 1-2, p. 2-12, 2013.

MARQUES, C.; BELAS, A.; FRANCO, A.; ABOIM, C.; GAMA, L. T.; POMBA, C. Increase in antimicrobial resistance and emergence of major international high-risk clonal lineages in dogs and cats with urinary tract infection: 16 year retrospective study. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 73, n.2, p. 377-384, 2018. <<https://doi.org/10.1093/jac/dkx401>>

MARQUES, C.; GAMA, L.T.; BELAS, A.; BERGSTROM, K.; BEURLET, S.; BRIEND-MARCHAL, A.; BROENS, E. M.; COSTA, M.; CRIEL, D.; DAMBORG, P.; VAN DIJK, A. M.; VAN DONGEN, A. M.; DORSCH, R.; ESPADA, C. M.; GERBER,

B.; KRIITSEPI-KONSTANTINOY, M.; LONCARIC, I.; MION, D.; MISIC, D.; MOVILLA, R.; OVERESCH, G.; PERRETEN, V.; ROURA, X.; STREENBERGEN, J.; TIMOFTE, D.; WOLF, G.; ZANONI, R. G.; SCHMITT, S.; GUARDABASSI, L.; POMBA, C. European multicenter study on antimicrobial resistance in bacteria isolated from companion animal urinary tract infections. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n.1, p. 1-17, 2016. <<https://doi.org/10.1186/s12917-016-0840-3>>

MAGIORAKOS, A-P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULUS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistant. **Clinical Microbiology Infection**. v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012. <<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>>

MARTINS, L. R. L.; PINA, S. M. R.; SIMÕES, R. L. R.; MATOS, A. J. F.; RODRIGUES, P.; COSTA, P. M. R.; SALAZAR, A. Common phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns found in a case study of multiresistant E.coli from cohabitant pets, humans, and household surfaces. **Journal of environmental health**. v. 75, n. 6, p. 74-81, 2013.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Capítulo 45 – Infecções do Trato Urinário de Cães e Gatos. In:\_\_\_\_. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 5 ed – Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

OLIN, S.J; BARTGES, J.W. Urinary tract infections: treatment/comparative therapeutics. **The veterinary clinics of North America**, v. 45, n. 4, p. 721-746, 2015. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25824394/>>

OSUGUI, L.; CASTRO, A. F.P.; IOVINE, R.; IRINO, K.; CARVALHO, V. M. 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, n. 1-2, p. 242-247. 2014. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.027>>

PITOUT, J. D. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**. v. 3, p. 1-7, 2012. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00009>>

QEKWANA, D. N.; PHOPHI, L.; NAIDOO, V.; OGUTTU, J. W.; ODOI, A. Antimicrobial resistance among Escherichia coli isolates from dogs presented with urinary tract infections at a veterinary teaching hospital in South Africa. **BMC Veterinary Research**. v.14, n. 1, p. 1 – 6, 2018. <<https://doi.org/10.1186/s12917-018-1552-7>>

RAEISPOUR, M.; RANJBAR, R. Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic Escherichia coli strains. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**. v. 7, n. 118, p. 1-9, 2018. <<https://doi.org/10.1186/s13756-018-0411-4>>

RAHDAR, M.; RASHKI, A.; MIRI, H. R.; GHALEHNOO, M. R. Detection of pap, sfa, afa, foc, and fim Adhesin-Encoding Operons in Uropathogenic Escherichia coli Isolates Collected From Patients With Urinary Tract Infection. **Jundishapur Journal of Microbiology**. v. 8, n. 8, p. 1-6, 2015. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4600570/>>

RILEY, L.W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 20, n. 5, p. 380-390, 2014. <<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12646>>

SABATÉ, M.; MORENO, E.; PÉREZ, T.; ANDREU, A.; PRATS, G. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic Escherichia coli isolates. **Clinical Microbiology Infection**. V. 12, n.9, p. 880-886, 2006. <<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01461.x>>

SALGADO-CAXITO, M.; BENAVIDES, J. A.; ADELL, A. D.; PAES, A. C.; MORENO-SWITT, A. I. Global prevalence and molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing-Escherichia coli in dogs and cats – A scoping review and meta-analysis. **One Health**. v. 12, p. 1-15, 2021. <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/207622> >

SAPUTRA, S.; JORDAN, D.; MITCHELL, T.; WONG, H. S.; ABRAHAM, R. J.; KIDSLEY, A.; TURNIDGE, J.; TROTT, D. J.; ABRAHAM, S. Antimicrobial resistance in clinical Escherichia coli isolated from companion animals in Australia. **Veterinary Microbiology**. v. 211, paginas 43-50, 2017. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.09.014>>

SHAH, C.; BARAL, R.; BARTAULA, B.; SHRESTHA, L. B. Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. **BMC Microbiology**. v.19, n. 204, p. 1-6, 2019 <<https://link.springer.com/article/10.1186/s12866-019-1587-3>>

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 17, n. 1, p. 14-56, 2004. <<https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.14-56.2004>>

SUBASHCHANDRABOSE, S.; MOBLEY, H. L. T. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic Escherichia coli. **Microbiology Spectrum**. v. 3, n. 4, p. 1 – 32, 2015. <<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012>>

TERLIZZI, M. E.; GRIBAUDO, G.; MAFFEL, M. E. Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, p. 1-23, 2017. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>>

TOOMBS-RUANE, L. J.; BENSCHOP, J.; FRENCH, N. P.; BIGGS, P. J.; MIDWINTER, A. C.; MARSHALL, J. C.; CHAN, M.; DRINKOVIC, D.; FAYAZ, A.; BAKER, M. G.; DOUWES, J.; ROBERTS, M. G.; BURGESS, S. A. Carriage of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- and AmpC Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli Strains from Humans and Pets in the Same Households. **Applied and**

**Environmental Microbiology.** v. 86, n. 24, p. 613-1620, 2020. <<https://doi.org/10.1128/AEM.01613-20>>

TOVAL, F.; SCHILLER, R.; MEISEN, I.; PUTZE, J.; KOUZEL, I. U.; ZHANG, W.; KARCH, H.; BIELASZEWASKA, M.; MORMANN, M.; MUTHING, J.; DOBRINDT, U. Characterization of Urinary Tract Infection-Associated Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity.** v. 82, n. 11, p. 4631-4642, 2014. <<https://doi.org/10.1128/IAI.01701-14>>

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, n. 3-4, p. 171-178, 2014. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.003>>

WEESE, J. S.; BLONDEAU, J. M.; BOOTHE, D.; BREITSCHWERDT, E. B.; GUARDABASSI, L.; HILLIER, A.; LLOYD D. H.; PAPICH, M. G.; RANKIN, S. C.; TUMIDGE, J. D.; SYKES, J. E. Antimicrobial use guidelines for treatment of urinary tract in dogs and cats: antimicrobial guidelines working group of the international society for companion animal infectious diseases. **Veterinary Medicine International.** p. 1-9, 2011. <<https://doi.org/10.4061/2011/263768>>

WEESE, J. S.; BLONDEAU, J.; BOOTHE, D.; GUARDABASSI, L. G.; GUMLEY, N.; PAPICH, M.; JESSEN, L. R.; LAPPIN, M.; RAKIN, S.; WESTROPP, J. L.; SYKES, J. International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID) Guidelines for the diagnosis and management of bacterial urinary infections in dogs and cats. **The Veterinary Journal.** v. 247, p. 8-25, 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.02.008>>

**CAPITULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGÊNICAS ISOLADAS DE CÃES GATOS  
– VERSÃO PARA SUBMISSÃO REVISTA “ONE  
HEALTH”**

## CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA EXTRAIESTINAL DE INFECÇÕES DE TRATO URINÁRIO DE CÃES E GATOS

SOARES, M. T.<sup>1</sup>; KIMURA, A. H.<sup>2</sup>; MEDEIROS, L. P.<sup>3</sup>; GAZAL, L. E. S.<sup>4</sup>;  
KOBAYASHI, R. K. T.<sup>4</sup>; NAKAZATO, G.<sup>5</sup>; ZANUTTO, M. S.<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Mestranda em clínicas veterinárias – Universidade Estadual de Londrina. E-mail: mirella.tomaz.soares@uel.br

<sup>4</sup> Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada - Universidade Estadual de Londrina. E-mail: kobayashirkt@uel.br

<sup>5</sup> Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada – Universidade Estadual de Londrina. E-mail: gnakazato@uel.br

<sup>6</sup> Departamento de Clínicas Veterinárias – Universidade Estadual de Londrina. E-mail: mzanutto@uel.br

### RESUMO

*Escherichia coli*, além de ser um importante comensal da microbiota intestinal, existem cepas capazes de causar infecções em outros sítios. E tem se observado uma frequência cada vez maior de bactérias multirresistentes. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo isolamento, identificação de perfis de resistência antimicrobiana, genes de virulência e de grupos filogenéticos entre cepas de *E.coli*, de infecção de trato urinário. Sendo possível identificar alta prevalência de cepas multirresistentes das cepas de infecção de trato urinária, em 66,67% dos isolados de cães e 40% de gatos. Dos fatores de virulência, houve alta prevalência dos genes *FyuA*, *iutA*, *Iss*, *ompT* e *hlyF*, tanto em cães como em gatos com infecção de trato urinário. No tocante, classificação filogenética, o grupo B2 foi o mais frequente tanto em isolados de cães (42,85%) quanto em gatos (60%) com infecção de trato urinário. Nas amostras de prostatite o grupo desconhecido e A ou C puderam ser observados. Pode-se constatar que houve semelhança do presente trabalho com outros, tanto em medicina veterinária quanto medicina humana, além de altas porcentagens de resistência. Este dado reforça o risco de disseminação de cepas multirresistentes entre animais de companhia e humanos, sendo um risco potencial para saúde pública.

**Palavras-chave:** Bactéria, multirresistência, virulência.

## 1 INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* (*E.coli*) é um micro-organismo versátil, pois embora seja um importante comensal da microbiota intestinal normal, existem cepas capazes de causar infecções (BÉLANGER et al., 2011; RILEY, 2014). *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) representa um grupo importante, que causa diversas afecções tanto em animais quanto humanos, incluindo infecções de trato urinário (ITU's), meningite e septicemia (BÉLANGER et al., 2011).

*E. coli* uropatogênica (UPEC), que acomete o trato urinário, difere das cepas intestinais pelos seus genes de virulência, permitindo uma transição bem sucedida do trato intestinal para o trato urinário (QEKWANA et al., 2018). Estes genes incluem componentes estruturais de superfície, como adesinas e fimbrias, toxinas, hemolisinas, mecanismos para a subversão das defesas do hospedeiro, e múltiplos sistemas de aquisição de ferro (LUO et al., 2012; TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEL, 2017). As ilhas de patogenicidade (PAI's) são elementos genéticos móveis que carregam grupos de genes de virulência (SABATE et al., 2006).

Essas cepas de ExPEC pertencem principalmente aos grupos filogenéticos B2 e D, diferenciando das cepas comensais, que estão em sua maior parte inclusas nos grupos A e B1 (OSUGUI et al., 2014; RAEISPOUR; RANJBAR, 2018).

Há evidências de que o contato direto entre humanos e animais de companhia pode levar à transmissão interespecífica de bactérias patogênicas, incluindo cepas com resistência antimicrobiana. (MARTINS et al., 2013; CUMMINGS, APREA, ALTIER, 2015).

O uso de técnicas moleculares auxilia na coleta de evidências crescentes de que os animais podem constituir um reservatório de ExPEC, sendo dessa forma uma ameaça à saúde humana (BÉLANGER et al., 2011).

Diante disso, o objetivo deste estudo foi o isolamento e a identificação dos perfis de resistência antimicrobiana, genes de virulência, ilhas de patogenicidade e grupos filogenéticos entre cepas de *E. coli* isoladas de ITU's de cães e gatos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Isolados e isolados bacterianos

Cepas de *E. coli* foram isoladas da urina de 25 pacientes (21 cães e 4 gatos) com ITU, coletada pelos médicos veterinários do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL), no período de 2015 a 2020, com intuito de apoiar o diagnóstico e conduta terapêutica. Após o isolamento e identificação de *E. coli* de urina, os isolados foram acondicionados em recipientes estéreis e mantidos refrigerados, em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco®) mais 20% de glicerol (Sigma®) a -80°C, no laboratório de microbiologia do HV-UEL. E posteriormente processados no laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas da UEL (CCB-UEL), onde foi realizada a identificação das colônias em ágar Mac Conkey e a confirmação bioquímica das cepas. E posteriormente teste de sensibilidade aos antimicrobianos, detecção de genes de virulência, ilhas de patogenicidade e classificação filogenética por meio da reação em cadeia da polimerase.

## **2.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos**

O teste de sensibilidade antimicrobiana dos isolados de *E. coli* foi processado pelo uso do método de difusão em disco, em ágar Mueller-Hinton, de acordo com protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Foram testados os antimicrobianos: amoxicilina com clavulanato de potássio, aztreonam, ampicilina, cefalotina, cefotaxima, cefepime, cefoxitina, ceftriaxona, ciprofloxacina, cloranfenicol, enrofloxacina, gentamicina, imipenem, nitrofurantoína, sulfametaxazol+trimetoprim, tetraciclina.

Para determinar os perfis de sensibilidade dos isolados seguiram-se os procedimentos do CLSI para classificação (CLSI 2007, CLSI 2011, CLSI 2010). E a identificação de cepas  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) foi feita por meio do teste de sinergia de disco duplo, conforme descrito pelas diretrizes do CLSI. A detecção de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC não são padronizados pelo CLSI, mas foram baseados na sensibilidade as cefamicinas (cefoxitina) e resistência a todos os inibidores de  $\beta$ -lactamases.

## **2.3 Detecção dos genes de virulência por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Foi realizada a pesquisa de sete genes de virulência. Dentre eles: *iroN* (receptor de sideróforo de salmochelina), *ompT* (protease epissomal da membrana externa), *hlyF* (hemolisina aviária putativa), *Iss* (epissomal de sobrevivência sérica aumentada), *iutA* (receptor de sideróforo de aerobactina), *hlyA* (alfa-hemolisina) e *FyuA* (receptor de sideróforo de yersiniabactina). A amplificação do DNA bacteriano foi realizada utilizando 2,5 µl de sobrenadante em 12,5 µl de mistura de reação, que continha 1,2 U Taq polimerase (Invitrogen®), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão de PCR 10X (Invitrogen®) e os iniciadores necessários. Em seguida, dez microlitros de cada mistura da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, seguido de coloração com 1 µl de gel Red 20x (Biotium®) (1:500) e feita a visualização em transiluminador UV. E dessa forma uma escala de DNA de 1 Kb (Invitrogen®) foi corrida em cada gel.

#### **2.4 Detecção de ilhas de patogenicidade (PAI)**

Foram analisadas cinco PAI's por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR): PAI IV536, PAI IICFT073, PAI I 536, PAI II536 e PAI IJ96. Os isolados foram submetidos à PCR em um termociclador (Applied Biosystems®) com temperatura de hibridação de 55°C conforme utilizado por Sabaté e colaboradores (2006).

#### **2.5 Classificação filogenética**

Os isolados de *E.coli* foram classificados sete grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E e F) e um correspondente a *E. coli* clade I, com base na presença dos genes *chuA*, *yjaA* e *arpA* e um fragmento de DNA (TSPE4.C2), detectados pelo método PCR (CLERMONT et al., 2013).

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Características clínico-epidemiológica**

Um total de 26 isolados de ITU's causadas por *E. coli* foram analisadas ao longo do estudo. Estes foram provenientes de amostras de urina de 23 pacientes (21 cães e 4

gatos), visto que, em dois isolados foi possível identificar duas cepas *E. coli* distintas do material coletada do mesmo animal. Além disso, em um paciente houve a coleta de urina e isolamento de *E. coli* em dois momentos distintos para acompanhamento de seu tratamento.

### 3.2 Sensibilidade aos antimicrobianos

Dos isolados de *E. coli* de cães houve alta taxa de resistência à cefalotina (90,4%), enrofloxacina (61,90%), de forma que sulfazotrim, cloranfenicol e ciprofloxacina apresentaram todos a mesma frequência (57,14%). Ampicilina e tetraciclina tiveram frequência de resistência de 52,38%, amoxiciclina com clavulanato de potássio foi resistente em 42,85% dos isolados, ceftriaxona em 38,09%, cefotaxina em 33,33% e ao aztreonam e cefoxitina 28,57% das isolados. Já gentamicina demonstrou ser resistente em 23,80% dos isolados, seguida por cefepime (14,28%). E por fim, imipenem e nitrofurantoína não demonstraram resistência a nenhuma das isolados avaliadas (Gráfico 1). Por meio dessa análise, 66,67% dos isolados de cães puderam ser classificadas como resistentes à múltiplos fármacos (MDR). Além disso, pode-se constatar que 9,52% desses isolados puderam ser classificados como ESBL (Figura 1).

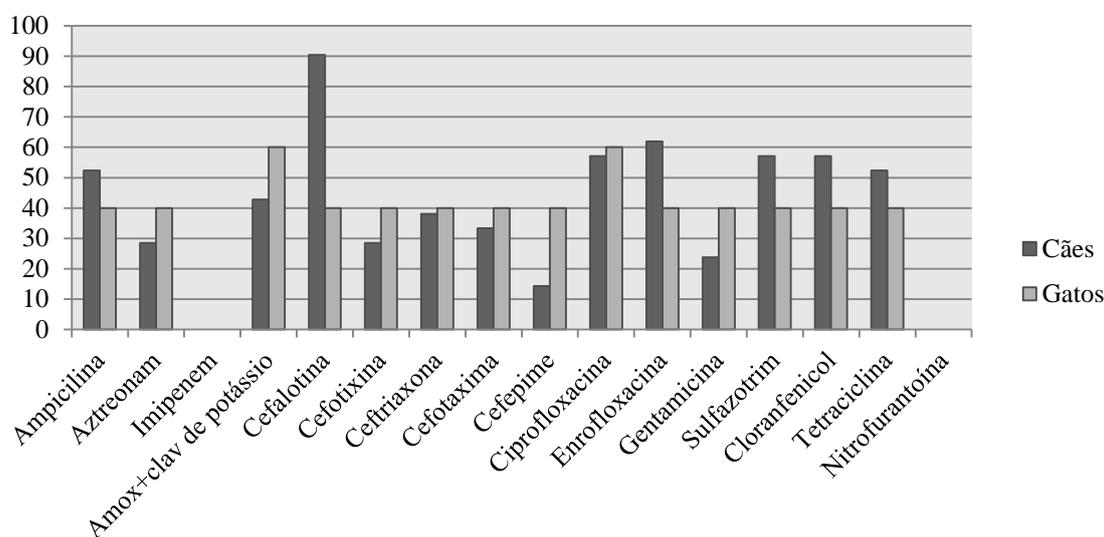
**Figura 1** - Teste de sensibilidade antimicrobiana em placas de ágar Mueller-Hinton, em que se é possível identificar fenotipicamente uma cepa ESBL (placa à esquerda), pelo teste de disco combinado, por meio da distorção do halo ao redor do disco  $\beta$ -lactâmico (amoxicilina com clavulanato de potássio) (centro da placa (➡)). E outra cepa multirresistente (MDR) (à direita), reconhecidas, em testes precedentes, como *Escherichia coli* urinária (UPEC), ambas de um mesmo portador canino.



Fonte: SOARES, M. T.

Os antibióticos mais resistentes entre os isolados de gatos foram cefalotina e ciprofloxacina, ambos com a frequência de 60%. Os demais antibióticos (ampicilina, aztreonam, amoxicilina com clavulanato de potássio, cefotixina, ceftriaxona, cefepime, enrofloxacina, gentamicina, sulfazotrim, cloranfenicol e tetraciclina) foram resistentes em 40% dos isolados (Gráfico 1). De modo que, imipenem e nitrofurantoína foram sensíveis em todos isolados. Sendo que 40% isolados puderam ser classificados como MDR.

**Gráfico 1** – Prevalência de resistência aos antimicrobianos entre os isolados de *E.coli* de ITU em cães e gatos, atendidos, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UDEL), no período de 2015 a 2020.

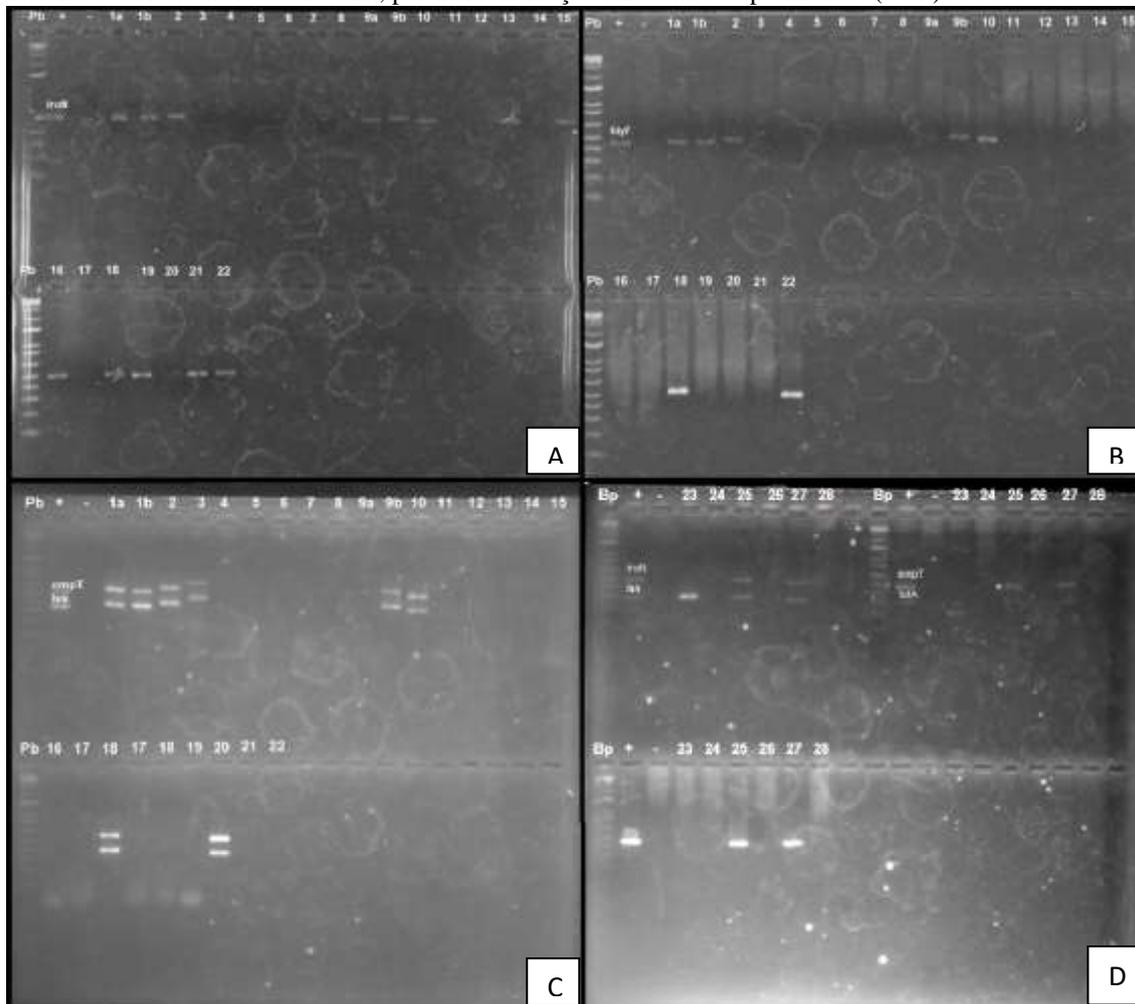


### 3.3 Distribuições de fatores de virulência e ilhas de patogenicidade

A caracterização genotípica dos isolados demonstrou que nem todos apresentavam genes que codificam os fatores de virulência avaliados. Dos 21 isolados de cães, 76,19% possuía ao menos um dos genes de virulência. Já dos cinco isolados de felinos, 80% apresentaram ao menos um dos genes. De maneira que o gene *FyuA*, apresentou alta frequência tanto nos isolados de cães como de gatos, 61,90% e 80%, respectivamente. E, em felinos, o gene *Iron*, esteve também com a mesma frequência do gene *FyuA* (80%), já em cães, ele esteve presente em 46,61% dos isolados. Os demais genes pesquisados, em cães, *iutA*, *Iss*, *ompT*, *hlyF*, estiveram presentes em 38,09%, 28,57%, 23,80% e 19,04%, respectivamente. E em felinos, os demais genes, *iutA*, *Iss*,

*ompT*, *hlyF* estiveram presentes com a mesma frequência de 40% nos isolados avaliados (Figura 2).

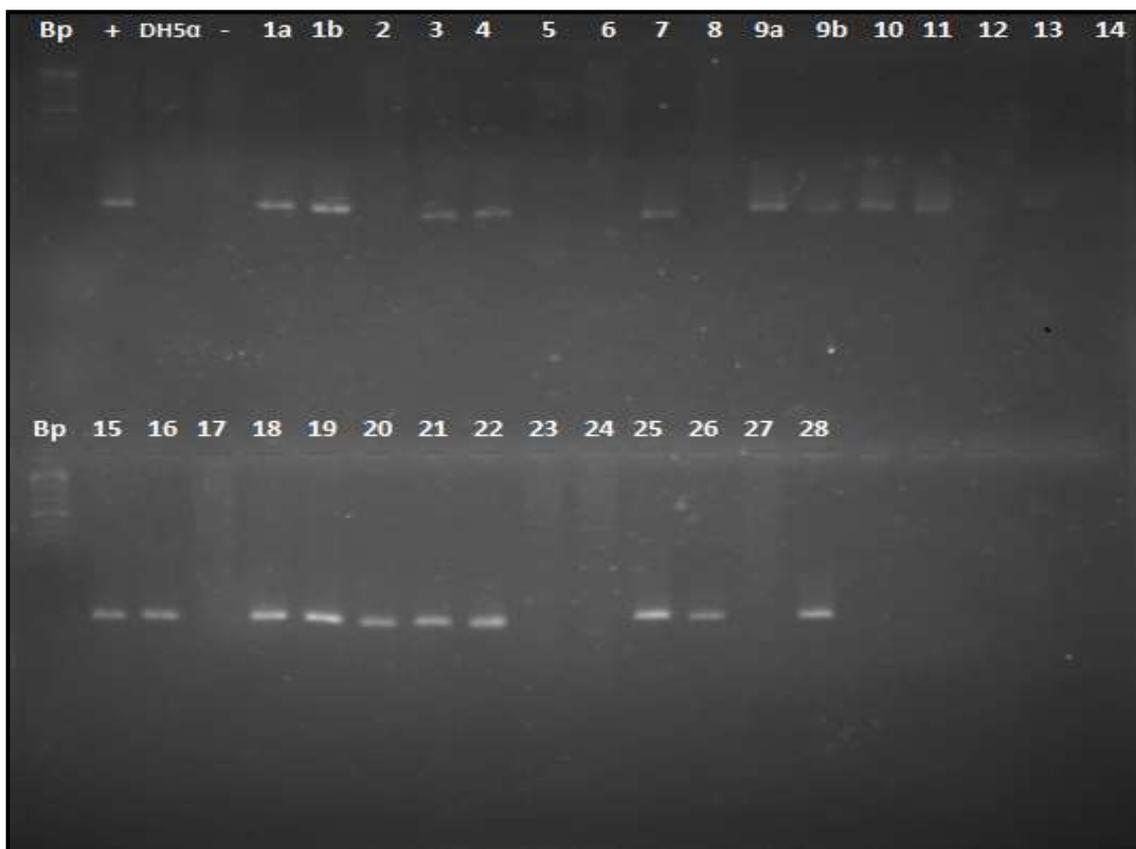
**Figura 2** – Gel Gel de agarose demonstrando os genes de virulência *IroN*, *hlyF*, *ompT* e *Iss* dos isolados 1a à 28 e *iutA* dos isolados 23 à 28, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).



Legenda: 2. Identificação de genes de virulência por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), em gel de agarose. Pb – padrão de peso molecular; (+) – controle positivo para o gene avaliado em questão; (-) – água, como controle negativo. A) Identificação do gene *IroN* nas isolados de 1a à 22. B) Identificação do gene *hlyF* nas isolados de 1a à 22. C) Identificação dos genes *ompT*, *Iss* das isolados de 1 à 22. D) Identificação dos genes *iroN*, *Iss*, *ompT*, *iutA* e *hlyF* das isolados 23 à 28.

As PAI's que mais se destacaram entre os isolados de cães foram a PAI IV 536 (Figura 3), PAI ICFT073 e PAI II536, presentes em 23,81% dos isolados, seguida pela PAI I536 (19,04%) e PAI IJ36 (9,52%). Em felinos, a PAI mais prevalente foi a PAI IV536, com 80% dos isolados positivos, seguida pela PAI ICFT073 (40%), e PAI I536 e PAI II536, ambas presentes em 20% dos isolados. Sendo que o gene PAI IJ36 não esteve presente em nenhum desses isolados de gatos.

**Figura 3** – Gel de agarose demonstrando o gene *Irp2*, responsável pela expressão da ilha de patogenicidade PAI IV563, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).



*Legenda:* Bp – padrão de peso molecular; (+) – controle positivo para o gene avaliado (*Irp2*) em questão; DH5α – cepa de controle negativo; (-) – água, como controle negativo.

### 3.4 Classificação filogenética

O grupo filogenético mais frequente foi o B2, em 42,85% dos isolados de cães e 60% dos gatos. O segundo mais prevalente, em cães foi o grupo filogenético desconhecido, presente em 23,09% dos isolados. Sendo que em gatos, o grupo filogenético desconhecido também foi identificado (40%), assim como, o grupo F (40%).

Em cães, além dos grupos acima citados, foi possível constatar 14,28% isolados pertencentes ao grupo E ou Clad I, e na mesma frequência também o A ou C. Já o grupo filogenético Clad I ou II foi identificado em apenas 4,76% dos isolados.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Características clínico-epidemiológicas

No presente estudo, dos 23 pacientes com infecção do trato urinário, 82,6% eram cães e 17,4% gatos. Essas afecções costumam ser mais frequentes em cães do que em gatos (NELSON; COUTO, 2015; LEOMIL; BURGOS, 2015). O fato da baixa ocorrência de infecções bacterianas em gatos pode ter relação com algumas características fisiológicas desses indivíduos, como seus mecanismos locais de defesa. (LEOMIL; BURGOS, 2015).

#### **4.2 Sensibilidade aos antimicrobianos**

Houve alta taxa de resistência aos antibióticos cefalotina, enrofloxacin, sulfazotrim, cloranfenicol, ciprofloxacina, ampicilina e tetraciclina em mais da metade dos isolados de cães. Sendo que em felinos cefalotina e ciprofloxacina apresentaram maior frequência entre os isolados. Estudos recentes (CUMMINGS, APREA, ALTIER, 2015; MARQUES et al., 2018 ) relatam um aumento da resistência à fluorquinolonas (COHN et al., 2003; HARADA et al., 2010), assim como cefalosporinas (DAZIO et al., 2021). Na prática clínica, por vezes, essas classes de antimicrobianos são utilizadas com frequência em infecções de trato urinário, assim como a sulfametoxazol+trimetoprim, que inclusive é recomendada como fármaco de primeira escolha para tratamento de ITU (WEESE et al., 2019).

Todos isolados de cães e gatos foram sensíveis à imipenem e nitrofurantoína. Em outros estudos também houve sensibilidade total ao imipenem (ASLANTAS; YILMAZ, 2017; HUANG, KUANG, YEH, 2020) e nitrofurantoína (KOGIKA et al., 1995), em isolados de *E. coli* oriundos de ITU de cães e gatos. Dados esses também encontrados na medicina humana (TERLIZZI; GRIBAUDO MAFFEI, 2017; RAEISPOUR; RANJBAR, 2018).

Foi possível constatar que mais da metade dos isolados de cães puderam ser classificados como MDR e 40% dos isolados de gatos. Outros estudos realizados verificaram o aumento da resistência antimicrobiana em cães e gatos (HARADA et al., 2010; OSUGUI et al., 2014; MARQUES et al., 2018). Diversos podem ser os fatores relacionados à presença MDR entre os isolados, dentre eles, o fato de grande parte dos pacientes em questão terem histórico de tratamento com antimicrobianos sistêmicos precedentes. Outros estudos puderam também constatar que esse é um fator de risco importante para o desenvolvimento de micro-organismos multirresistentes (TUERENA et al., 2016; SAPUTRA et al., 2017; KARKABA et al., 2019; DAZIO et al., 2021).

Por meio do teste de sinergia de disco duplo, 9,52% dos isolados de cães foram identificados como ESBL e baseado na sensibilidade às cefamicinas e resistência aos inibidores de  $\beta$ -lactamases, 19,05% lactamases do tipo AmpC. Já em felinos nenhum dos isolados foi identificado como ESBL e nem como AmpC. A prevalência global de *E.coli* ESBL foi avaliada em 6,87% em cães e 5,04% em gatos (SALGADO-CAXITO et al, 2021). Em outro estudo, além do tratamento anterior com antimicrobiano, outros fatores citados como responsáveis pelo surgimento de *E. coli* ESBL ou AMPC, foram contato frequente com clínicas veterinárias e viagens internacionais (KARKABA et al., 2019).

Em um estudo feito por Toombs-Ruane e colaboradores (2020), por meio da análise do genoma de *E.coli* em 11 domicílios, foi possível identificar a mesma cepa de *E. coli* produtora de ESBL/AmpC entre cães e membros da família com ITU. Assim como, Ljungquist e colaboradores (2016), em que cepas idênticas de Enterobacteriaceae ESBL puderam ser isoladas de humanos e cães que coabitam ambientes domésticos. Logo, possivelmente há uma transmissão entre humanos e cães e gatos de ExPEC, o que evidencia o risco para saúde pública.

#### **4.3 Fatores de virulência, ilhas de patogenicidade e classificação filogenética**

O ferro tem importância significativa para a vida de grande parte dos organismos, sendo indispensável para que as bactérias patogênicas persistam em infecções (WILSON et al., 2017). A maior prevalência entre os genes de virulência avaliados foi do sideróforo yersiniabactina (*FyuA*), tanto em cães (46,61%), quanto em gatos (80%). Assim como em diversos outros estudos, em veterinária (OSUGUI et al., 2014; JOHNSON et al., 2017) e na medicina humana (JOHNSON; STELL, 2000; CYOIA et al., 2015; KARAM et al., 2018; DAGA et al., 2019).

Outros sistemas de aquisição de ferro, gene *Iron* e *iutA*, estiveram presentes entre os isolados de cães na frequência de 46,61% e 38,09% respectivamente. De modo que o *Iron* se apresentou na mesma frequência do *FyuA* entre os gatos (80%), bem como o *iutA* esteve presente em 40% dos isolados. A maior prevalência desses genes reforça a premissa de que eles estão em predomínio entre as ExPEC, conjuntamente com os genes de adesão (LIU; THUNGRAT; BOOTHE, 2015).

Os genes de aderência são indispensáveis para o estabelecimento das infecções. Neste estudo avaliamos a presença da proteína de membrana externa (*Omps*). Entre os

isolados de cães, 23,80% possuíam o gene que expressa essa proteína, e entre os de gatos, 40%. Similarmente aos dados observados em cães, outros estudos em humanos encontraram a frequência de expressão de *OmpT* de aproximadamente 20% (CYOIA et al., 2015; DAGA et al., 2019)

Com relação aos genes relacionados à produção de hemolisina, entre os isolados de cães, *hlyF* esteve presente na frequência de 19,04% e entre os gatos 40%. De maneira similar aos cães, esse gene foi observado em 20,8% de isolados de infecções da corrente sanguínea por *E. coli* (DAGA et al., 2019), e em 19,8% dos isolados de ExPEC (LÓPEZ-BANDA et al., 2014), ambos de humanos. Já o gene  $\alpha$ -haemolisina (*hlyA*) não foi detectado em nenhum dos isolados de ITU tanto em cães quanto em gatos, sendo que estudos em humanos variou entre os valores de 1,9% (LÓPEZ-BANDA et al., 2014), 14,6% (DAGA et al., 2019) e 18,75% (CYOIA et al., 2015).

Já o gene *Iss*, responsável pela proteína associada à resistência do soro (JOHNSON et al., 2008), foi detectado em 28,57% dos isolados de cães, e em 40% dos gatos, com ITU. Prevalência semelhante à dos cães foi observada em estudo de ExPEC humana, com frequência de 20% (CYOIA et al., 2015).

As ilhas de patogenicidade mais prevalente entre os isolados de cães foram PAI IV 536, PAI ICFT073 e PAI II536, com a frequência de 23,81% e 19,04% de PAI I536, respectivamente. E em felinos, a mais frequente foi a PAI IV 536 (80%), seguida pelas IICFT073 (40%) e PAI I536 e PAI II536, ambas com 20% de frequência. Entre os isolados de cães e gatos, o gene PAI IJ36 foi o menos incidente. Os dados apoiam estudos precedentes, que também demonstraram alta prevalência do marcador PAI IV 536 (SABATÉ et al., 2006; CYOIA et al., 2015; DAGA et al., 2019) e baixa prevalência de PAI I536 e PAI IJ96 (SABATÉ et al., 2006).

De acordo com a classificação filogenética o grupo de maior incidência avaliado neste trabalho foi o B2, tanto em cães (42,85%), quando entre os gatos (60%). Como já comprovado na literatura, o grupo B2 é responsável por representar a maioria das cepas de *E. coli* UPEC, em cães e gatos (OSUGUI et al, 2014; HARADA et al., 2010; LIU; THUNGRAT; BOOTHE, 2015; HUTTON et al., 2017) e em humanos (LÓPEZ-BANDA et al, 2004; RAHDAR et al., 2015; JOHNSON et al., 2017; HUTTON et al., 2017).

Entre os isolados de cães, 76,19% possuíam ao menos um dos genes de virulência e PAI's avaliados. Sendo que dos isolados classificados no grupo B2, 88,90% tinham ao menos um fator de virulência presente e todos possuíam ao menos uma PAI.

Além disso, foi possível constatar que a maioria (66,70%) das isolados de cães, inclusos no grupo B2 foram classificadas como sensíveis no teste de sensibilidade aos antimicrobianos, assim como os isolados de gatos (66,7%). Osugui e colaboradores (2014) também constataram por meio da avaliação de ExPEC de cães e gatos que os isolados MDR foram observados, em sua maioria, em grupos distintos ao grupo B2. Assim como verificado em outros estudos, em humanos (JOHNSON; STELL, 2000; DAGA et al., 2019). Assim como em estudo feito com gatos com UPEC nos Estados Unidos, em que 84,6% dos isolados contidos no grupo B2 eram sensíveis (LIU; THUNGRAT; BOOTHE, 2015). E igualmente em cães, em que 67% dos isolados B2 demonstraram ser sensíveis (WAGNER; GALLY; ARGYLE, 2014).

Entre os isolados resistentes notou-se uma maior variedade dos genes de virulência pesquisados. De tal modo que, em 41,70% das isolados resistentes de cães notou-se mais de três fatores de virulência, enquanto nas isolados sensíveis apenas 22,22% apresentavam mais que três fatores de virulência. Da mesma forma, em felinos, entre os resistentes todos possuíam mais do que três fatores de virulência, e os isolados sensíveis apenas 33,33% tinham essa diversidade de característica. Na Medicina Humana (SHAH et al., 2019; KARAM; HABIBI; BOUZARI, 2018) e na veterinária (OSUGUI et al., 2014), observaram uma prevalência maior de MDR em UPEC virulentas. E este achado possivelmente tenha relação com a presença conjunta de genes de resistência e fatores de virulência em elementos transferíveis de resistência, como plasmídeos e íntegros (KOCZURA et al., 2012).

Houve também uma diversidade maior de PAI's, todavia, entre os isolados sensíveis, pois em cães 33,33% dos isolados sensíveis tinham mais do que três ilhas de patogenicidade, sendo de 16,66% essa frequência de ilhas entre os isolados resistentes. E em felinos, somente entre as cepas sensíveis foi possível verificar a frequência de 33,33% de mais do que três PAI's caracterizadas. Este fenômeno pode estar relacionado com o fato de que muitos fatores de virulência estão presentes em PAI's, e alguns estudos relataram que a aquisição de resistência a determinados antimicrobianos podem causar a perda em regiões do cromossomo onde estão presentes essas ilhas de patogenicidade (CEPAS; SOTO, 2020).

Dentre os demais genes de virulência avaliados, pode-se inferir sobre uma relação observada entre o iutA e a resistência a múltiplos antimicrobianos, pois dos isolados de cães reagentes para tal gene, 77,8% eram multirresistentes. Assim como, dos isolados de gatos, os multirresistentes foram positivos para o gene iutA. A

constatação dessa frequência mais alta desse gene em isolados MDR já foi descrita em estudo precedente (LIU; THUNGRAT; BOOTHE, 2015)

## 5 CONCLUSÃO

As cepas de EXPEC de cães e gatos avaliadas apresentaram semelhanças filogenéticas com isolados de humanos, além de isolados multirresistentes. Este dado reforça a evidência do risco de disseminação de cepas multirresistentes entre humanos e animais.

E mesmo que o número de isolados avaliadas não tenha sido expressivo, este estudo fornece informações úteis e importante sobre a distribuição filogenética, identificação fenotípica de ESBL e AmpC em UPEC's.

Este estudo reforça a necessidade de monitoramento das taxas de resistência antimicrobiana locais, pois por meio disso podemos orientar as práticas de uso dessa classe de fármacos. E o estudo da virulência e resistência aos antibióticos às diversas cepas de *E. coli*, desde comensais até patogênicas é de capital importância no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Sendo que o conhecimento entre a correlação entre fatores de virulência e a multirresistência poderia auxiliar na compreensão de pacientes com infecção do trato urinário, reduzindo o uso impróprio de antibióticos.

## REFERÊNCIAS

BÉLANGER, L.; GARENAUX, A.; HAREL, J.; BOULIANNE, M.; NADEAU, E.; DOZOIS, C. M. Escherichia coli from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic E.coli. **FEMS Immunology & Microbiology**. v. 62, n. 1, p. 10-11, 2011.

CYOIA, P. S.; RODRIGUES, G. R.; NISHIO, E. K.; MEDEIROS, L. P.; KOGA, V. L.; PEREIRA, A. P. D.; VESPERO, E. C.; HOULE, S.; DOZOIS, C. M.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. T. Presence of virulence genes and pathogenicity islands in extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolates from Brazil. **Journal of infection in developing countries**. v. 9, n. 10, p. 1068 -1075, 2015. <<https://doi.org/10.3855/jidc.6683>>

CEPAS, V.; SOTO, S. M. Relationship between Virulence and Resistance among Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics**. v. 9, n. 10, p. 1-11, 2020. <<https://doi.org/10.3390/antibiotics9100719>>

CUMMINGS, K. J. ; APREA, V. A.; ALTIER,C. Antimicrobial resistance trends among canine Escherichia coli isolates obtained from clinical samples in the northeastern USA, 2004-2011. **Canadian Veterinary Journal**. v. 56, n. 4, p. 393-398, 2015. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4357913/>>

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, n. 1, p. 58-65, 2013. < <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>>

COHN, L. A.; GARY, A. T.; FALES, W. H.; MADSEN, R. W. Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tract. **Journal veterinary diagnostic investigation** v. 15, n. 2, p. 338-343, 2003. < <https://doi.org/10.1177/104063870301500406>>

DAGA, A. P.; KOGA, V. L.; SONCINI, J. G. M.; MATOS, C. M.; PERUGINI, M. R. E.; PELISSON, M.; KOBAYASHI, R. K.T.; VESPERO, E. C. Escherichia coli Bloodstream Infections in Patients at a University Hospital: Virulence Factors and Clinical Characteristics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v.9, n. 191, p.1-10, 2019 <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00191>>

DAZIO, V.; NIGG, A.; SCHMIDT, J. S.; BRILHANTE, M.; MAURI, N.; KUSTER, S. P.; BRAWAND, S. G.; SCHUPBACH-REGULA, G.; WILLI, B.; ENDIMIANI, A.; PERRETTEN, V.; SCHULLER, S. Acquisition and carriage of multidrug-resistant organisms in dogs and cats presented to small animal practices and clinics in Switzerland. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 35, n.2, p. 970-979, 2021. <<https://doi.org/10.1111/jvim.16038>>

HUANG, Y-H.; KUAN, N-L.; YEH, K-S. Characteristics of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing Escherichia coli From Dog and Cats Admitted to a Veterinary Teaching Hospital in Taipei, Taiwan From 2014 to 2017. **Frontiers in Veterinary Science**. v. 7, n. 395, p. 1-9, 2020. <<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00395>>

HUGONNARD, M.; CHALVET-MONFRAY, K.; POUZOT-NEVORET, C.; BARTHÉLÉMY, A.; VIALARD, J.; GOY-THOLLOT, I. Occurrence of bacteriuria in 18 catheterised cats with obstructive lower urinary tract disease: a pilot study. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.15, n. 10, p. 843-848, 2013. < <https://doi.org/10.1177/1098612X13477414>>

HUTTON, T. A.; INNES, G. K.; HAREL, J.; GARNEAU, P.; CUCCHIARA, A.; SCHIFFERLI, D. M.; RANKIN. S. C. Phylogroup and virulence gene association with clinical characteristics of Escherichia coli urinary tract infections from dogs and cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 30, n. 18, p. 64-70, 2017. <<https://doi.org/10.1177/1040638717729395>>

JOHNSON, J. R.; STELL, A. 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, n.1, 261-272, 2000. < <https://doi.org/10.1086/315217>>

JOHNSON, T. J.; WANNENUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, S. J.; ROSENBERGER, S. C.; NOLAN, L.K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**. v.46, n.12, p. 3987-3996, 2008. <<https://doi.org/10.1128/JCM.00816-08>>

JOHNSON, J. R.; JOHNSTON, B. D.; DELAVARI, P.; THURAS, P.; CLABOTS, C.; SADOWSKY, M. J. Phylogenetic Backgrounds and Virulence -Associated Traits of *Escherichia coli* Isolates from Surface Waters and Diverse Animals in Minnesota and Wisconsin. **American Society for Microbiology**. v. 83, n. 24, p.1 - 10, 2017. <<https://doi.org/10.1128/AEM.01329-17>>

KARAM, M. R. A.; HABIBI, M.; BOUZARI, S. Relationships between Virulence Factors and Antimicrobial Resistance among *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infections and Commensal Isolates in Tehran, Ira. **Osong Public Health and Research Perspectives**. v.9, n.5, paginas 217-224, 2018. <<https://doi.org/10.24171/j.phrp.2018.9.5.02>>

KARKABA, A.; HILL, K.; BENSCHOP, J.; PLEYDELL, E.; GRINBERG, A. 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. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.015>>

KOCZURA, T.; MOKRACKA, J.; BRACZAK, A.; KRYSIAK, N.; KAZNOWSKI, A. Association between the Presence of Class 1 Integrons, Virulence Genes, and Phylogenetic Groups of *Escherichia coli* Isolates from River Water. **Microbial Ecology**. v. 65, n. 1, p. 84-90, 2012. <<https://doi.org/10.1007/s00248-012-0101-3>>

KOGIKA, M. M.; FORUNATO, A. B.; MAMIZUKA, E. M.; HAGIWARA, M. K.; PAVAN, M. F. B.; GROSSO, S. N. A. Etiology study of urinary tract infection in dog. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animals**. v. 32, n. 1, p. 31-36, 1995. <<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.1994.52087>>

LEOMIL, L.; BURGOS, Y. K. *Escherichia coli* e *Salmonella*. In: JERICÓ, M. M.; NETO, J. P. A.. **Trato de Medicina Interna de cães e gatos**. Local: ROCA, 2015, p. 2615-2633.

LIU, X. ; THUNGRAT, K.; BOOTHE, D. M. Multilocus Sequence Typing and Virulence Profiles in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Cats in the United States. **PLOS ONE**. v. 10, n. 11, p. 1-14, 2015. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.01043335>>

LJUNGQUIST, O.; LJUNGQUIST, D.; MYRENAS, M.; RYDÉN, C.; FINN, M.; BENGTTSSON, B. Evidence of household transfer of ESBL-/pAmpC-producing Enterobacteriaceae between humans and dogs – a pilot study. **Infection ecology and Epidemiology – The one health journal**. v. 6, p. 1 – 7, 2016. <<https://doi.org/10.3402/iee.v6.31514>>

LÓPEZ – BANDA, D. A.; CARRILLO-CASAS, E. M.; LEYVA-LEYVA, M.; OROZCO-HOYUELA, G.; MANJARREZ-HERNÁNDEZ, A. H.; ARROYO-ESCALANTE, S.; MONCADA-BARRÓN, D.; VILLANUEVA-RECILLAS, S.; XICOHTENCATH-CORTES, J.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R. Identification of Virulence Factors Genes in Escherichia coli Isolates from Women with Tract Infection in Mexico. **BioMed Research International**. p. 1 – 10, 2014. <[https://doi.org/ 10.1155 / 2014/959206](https://doi.org/10.1155/2014/959206)>

LUO, Y.; MA, Y.; ZHAO, Q.; WANG, L.; GUO, L.; YE, L.; ZHANG, Y.; YAN, J. Similarity and divergence of phylogenies, antimicrobial susceptibilities, and virulence factor profiles of Escherichia coli isolates causing recurrent urinary tract infections that persist or result from reinfection. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n.12, p. 4002 – 4007, 2012. <<https://doi.org/10.1128/JCM.02086-12>>

MARQUES, C.; BELAS, A.; FRANCO, A.; ABOIM, C.; GAMA, L. T.; POMBA, C. Increase in antimicrobial resistance and emergence of major international high-risk clonal lineages in dogs and cats with urinary tract infection: 16 year retrospective study. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 73, n.2, p. 377-384, 2018. <<https://doi.org/10.1093/jac/dkx401>>

MARTINS, L. R. L.; PINA, S. M. R.; SIMÕES, R. L. R.; MATOS, A. J. F.; RODRIGUES, P.; COSTA, P. M. R.; SALAZAR, A. Common phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns found in a case study of multiresistant E.coli from cohabitant pets, humans, and household surfaces. **Journal of environmental health**. v. 75, n. 6, p. 74-81, 2013.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Capítulo 45 – Infecções do Trato Urinário de Cães e Gatos. In:\_\_\_\_. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 5 ed – Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

OSUGUI, L.; CASTRO, A. F.P.; IOVINE, R.; IRINO, K.; CARVALHO, V. M. 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, n. 1-2, p. 242-247. 2014. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.027>>

QEKWANA, D. N.; PHOPHI, L.; NAIDOO, V.; OGUTTU, J. W.; ODOI, A. Antimicrobial resistance among Escherichia coli isolates from dogs presented with urinary tract infections at a veterinary teaching hospital in South Africa. **BMC Veterinary Research**. v.14, n. 1, p. 1 – 6, 2018. <[https://doi.org/ 10.1186/s12917-018-1552-7](https://doi.org/10.1186/s12917-018-1552-7)>

RAEISPOUR, M.; RANJBAR, R. Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic Escherichia coli strains. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**. v 7, n. 118, p. 1-9, 2018. <<https://doi.org/10.1186/s13756-018-0411-4>>

RAHDAR, M.; RASHKI, A.; MIRI, H. R.; GHALEHNOO, M. R. Detection of pap, sfa, afa, foc, and fim Adhesin-Encoding Operons in Uropathogenic Escherichia coli Isolates

Collected From Patients With Urinary Tract Infection. **Jundishapur Journal of Microbiology**. v. 8, n. 8, p. 1-6, 2015. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4600570/>>

RILEY, L.W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 20, n. 5, p. 380-390, 2014. <<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12646>>

SABATÉ, M.; MORENO, E.; PÉREZ, T.; ANDREU, A.; PRATS, G. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Clinical Microbiology Infection**. v. 12, n.9, p. 880-886, 2006. <<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01461.x>>

SALGADO-CAXITO, M.; BENAVIDES, J. A.; ADELL, A. D.; PAES, A. C.; MORENO-SWITT, A. I. Global prevalence and molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing-*Escherichia coli* in dogs and cats – A scoping review and meta-analysis. **One Health**. v. 12, p. 1-15, 2021. <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/207622> >

SAPUTRA, S.; JORDAN, D.; MITCHELL, T.; WONG, H. S.; ABRAHAM, R. J.; KIDSLEY, A.; TURNIDGE, J.; TROTT, D. J.; ABRAHAM, S. Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolated from companion animals in Australia. **Veterinary Microbiology**. v. 211, p. 43-50, 2017. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.09.014>>

SHAH, C.; BARAL, R.; BARTAULA, B.; SHRESTHA, L. B. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. **BMC Microbiology**. v.19, n. 204, p. 1-6, 2019 <<https://link.springer.com/article/10.1186/s12866-019-1587-3>>

TERLIZZI, M. E.; GRIBAUDO, G.; MAFFEL, M. E. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, p. 1-23, 2017. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>>

TOOMBS-RUANE, L. J.; BENSCHOP, J.; FRENCH, N. P.; BIGGS, P. J.; MIDWINTER, A. C.; MARSHALL, J. C.; CHAN, M.; DRINKOVIC, D.; FAYAZ, A.; BAKER, M. G.; DOUWES, J.; ROBERTS, M. G.; BURGESS, S. A. Carriage of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- and AmpC Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains from Humans and Pets in the Same Households. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 86, n. 24, p. 613-1620, 2020. <<https://doi.org/10.1128/AEM.01613-20>>

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, n. 3-4, p. 171-178, 2014. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.003>>

WEESE, J. S.; BLONDEAU, J.; BOOTHE, D.; GUARDABASSI, L. G.; GUMLEY, N.; PAPICH, M.; JESSEN, L. R.; LAPPIN, M.; RAKIN, S.; WESTROPP, J. L.; SYKES, J. International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID) Guidelines for the diagnosis and management of bacterial urinary infections in dogs and cats. **The Veterinary Journal.** v. 247, p. 8-25, 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.02.008>>

**CAPÍTULO 3 – *ESCHERICHIA COLI* EM CÃES E GATOS  
E SEU POTENCIAL ZONÓTICO – REVISÃO DE  
LITERATURA**

***Escherichia coli* em cães e gatos e seu potencial zoonótico –  
revisão de literatura**

***Escherichia coli* in dogs and cats and its zoonotic potential –  
literature review**

***Escherichia coli* em perros y gatos y su potencial zoonótico –  
revisión bibliográfica**

SOARES, M. T.<sup>1</sup>; NAKAZATO, G.<sup>2</sup>; KOBAYASHI, R. K. T.<sup>2</sup>; ZANUTTO, M. S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Aluno de pós-graduação - Universidade Estadual de Londrina - UEL- Londrina, PR

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Londrina – UEL – Londrina, PR

**Resumo:** Doenças zoonóticas são infecções transmitidas entre os humanos e outros animais. E embora as doenças em humanos pareçam ser uma preocupação isolada, grande parte é causada por agentes zoonóticos. Nesse cenário, em que há um contato cada vez mais próximo entre os animais de companhia e seus proprietários, a bactéria *Escherichia coli* (*E.coli*) se destaca, pelo fato de que além de ser uma bactéria comensal do trato intestinal de diversos animais, é uma das causas mais frequentes de diversas infecções bacterianas. E estudos recentes apontam que o contato entre humanos e animais possa contribuir para a transmissão entre espécies de cepas de *E.coli* produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) e lactamases do tipo AmpC, que são cepas resistentes a múltiplos antimicrobianos (multirresistentes). Contudo, mais estudos são necessários para que essa suposição seja confirmada. Diante desse fato, a revisão aborda o potencial zoonótico da *E.coli* a partir de pesquisas relacionadas com o achado de cepas patogênicas em animais e humanos.

**Unitermos:** Zoonoses, bactéria, multirresistência.

**Abstract:** Zoonotic diseases are infections transmitted between humans and other animals. And while disease in humans appears to be an isolated concern, much of it is caused by zoonotic agents. In this scenario, in which there is ever closer contact between pets and their owners, the *Escherichia coli* (*E.coli*)

bacteria stands out, because in addition to being a commensal bacteria in the intestinal tract of several animals, it is one of the most common causes of several bacterial infections. And recent studies indicate that contact between humans and animals can contribute to the transmission between species of *E. coli* strains that produce extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) and AmpC-type lactamases, which are resistant to multiple antimicrobials (multiresistant). However, more studies are needed for this assumption to be confirmed. Given this fact, the review addresses the relevance of this microorganism in infections from dogs and cats, thus highlighting its zoonotic potential.

**Keywords:** Zoonoses, public health, bacteria, multidrug resistance.

**Resumen:** Las enfermedades zoonóticas son infecciones transmitidas entre humanos y otros animales. Y aunque la enfermedad en los seres humanos parece ser una preocupación aislada, gran parte de ella es causada por agentes zoonóticos. En este escenario, en el que existe un contacto cada vez más estrecho entre las mascotas y sus dueños, destaca la bacteria *Escherichia coli*, que además de ser una bacteria comensal en el tracto intestinal de varios animales, es una de las causas más frecuentes de varias infecciones bacterianas. Y estudios recientes indican que el contacto entre humanos y animales puede contribuir a la transmisión entre especies de cepas de *E. coli* que producen  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y lactamasas de tipo AmpC, que son resistentes a múltiples antimicrobianos (multirresistentes). Sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar esta suposición. Ante este hecho, la revisión aborda la relevancia de este microorganismo en infecciones de perros y gatos, destacando así su potencial zoonótico.

**Palabras clave:** Zoonosis, salud pública, bacterias, multirresistencia.

## Introdução

Doenças zoonóticas são infecções que podem ser transmitidas naturalmente de outros animais vertebrados para humanos ou de humanos para outros animais vertebrados <sup>1</sup>.

As melhorias em vigilância e no diagnóstico de doenças tiveram como consequência um aumento no reconhecimento de doenças zoonóticas emergentes. Além disso, mudanças no estilo de vida e contatos mais próximos entre humanos e animais de companhia causaram ressurgimento de infecções bacterianas. Os animais de companhia são tratados cada vez mais como membros da família, e estes têm muitas bactérias que podem infectar seus proprietários<sup>1</sup>. Espécies de animais de estimação, de produção e seres humanos compartilham muito de sua história evolutiva, e por consequência, podem atuar como hospedeiros de microrganismos patogênicos, que podem facilmente ser transmitidos de uma espécie para outra <sup>2</sup>. Como os animais de companhia partilham o mesmo ambiente com pessoas, em relações cada vez mais estreitas, e podem ser portadores de microrganismos patogênicos para o Homem, há necessidade de identificação do papel dos animais como fonte de infecções zoonóticas <sup>3</sup>.

*Escherichia coli* é o microrganismo comensal do trato gastrointestinal de humanos e outros animais, e uma das causas mais frequentes de diversas infecções bacterianas <sup>4</sup>. E esse fato se agrava diante de estudos recentes que apontam que o contato entre humanos e animais de estimação possa contribuir para a transmissão de cepas de *E. coli*, dentre elas as conhecidas por bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases, que são cepas resistentes a múltiplos antimicrobianos (multirresistentes) <sup>4,5,6</sup>. A espécie *E. coli* é particularmente complexa, visto que tem se diversificado em comensais da microbiota intestinal e cepas patogênicas, divididas em dois principais grupos patogênicos: diarreiogênicas (DEC) e extraintestinais (ExPEC), de forma que algumas cepas poderiam apresentar potencial zoonótico <sup>7</sup>. Visto a sua eventual incidência sob a saúde pública, essa revisão aborda a possível participação desse microrganismo em infecções procedentes de cães e gatos, com destaque assim ao seu potencial zoonótico.

## **1 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é uma bactéria comensal da microbiota intestinal de diversos animais, inclusive humanos <sup>8,9</sup>. Contudo, existem cepas que podem

causar doenças tanto em humanos, quanto em outros mamíferos e aves. E dentre as cepas patogênicas há aquelas que causam doenças intestinais e outras que são extraintestinais, com base no sítio de infecção. As formas patogênicas de *E. coli* intestinais, causam principalmente diarreia, em maior ou menor gravidade, e os patótipos estão divididos entre *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) e enterohemorrágica (EHEC), de forma que este último pode causar uma doença mais grave, a síndrome hemolítico-urêmica (SHU) <sup>10,11</sup>.

### **1.1 *Escherichia coli* extraintestinal**

Um grupo importante é *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC), em humanos causa infecção de trato urinário (ITU), septicemia ou meningite em recém-nascidos, bem como infecções de trato urinário ou doença sistêmica em muitos animais <sup>10,11</sup>. Tanto essas cepas patogênicas humanas como de outros animais compartilham origens genéticas comuns <sup>11</sup>.

*E. coli* é uma das principais causas de infecções urinárias tanto em cães, quanto em humanos <sup>12,13,14</sup>. Há evidências de que, embora pouco se compreenda sobre a estrutura populacional de *E. coli* que causa ITU em cães, estes possam compartilhar cepas comensais com humanos <sup>11</sup>.

Já em felinos, a infecção de trato urinário é uma doença menos frequente, contudo, a bactéria *E.coli* também é o agente mais comumente isolado de gatos com ITU <sup>15</sup>. E assim, da mesma forma, apesar de haver menor prevalência, devido à crescente interação entre gatos e humanos, o risco de transmissão entre espécies deve ser considerado e conferido devida importância <sup>16</sup>.

Apesar das diversas pesquisas, ainda não há uma abordagem definida para diferenciação entre os patótipos de *E. coli* extraintestinal ou entre comensais e ExPEC. E devido a essa incapacidade de distinção clara entre ExPEC e *E. coli* não patogênica conclui-se que as cepas de ExPEC são patógenos facultativos, que se instalam por meio de ligação, aquisição de nutrientes, competição com outras bactérias e subversão dos mecanismos de defesa do hospedeiro <sup>11,17</sup>.

## **2 *Escherichia coli* e relevância em saúde pública**

### **2.1 Interação entre o homem e animais de companhia (cães e gatos)**

Animais de companhia são definidos como quaisquer animais domesticados, criados em casa ou selvagens, mantidos por pessoas para companhia, diversão, trabalho (por exemplo, cães policiais, apoio para cegos e surdos) ou apoio psicológico, incluindo desde cães e gatos até cavalos, coelhos, furões, porquinhos-da-índia, répteis, pássaros ou peixes ornamentais<sup>3</sup>.

Em nossa sociedade, a relação entre animais de companhia e seus donos tem se estreitado cada vez mais nas últimas décadas. E atualmente, os animais vivem em contato bem mais próximo com humanos do que tempos atrás<sup>18</sup>.

### **2.2 Transmissão entre espécies**

Há preocupações com a saúde pública devido ao possível risco de transmissão entre animais e humanos de cepas resistentes de *E. coli*, ou transferência de genes de resistência<sup>19, 20, 21</sup>.

Em estudo realizado na Argentina, em que a síndrome hemolítico-urêmica (SHU), causada pela *E.coli* produtora de toxina Shiga (STEC), é endêmica, foi possível constatar o isolamento da mesma em amostras fecais de 1,1% (5/450) dos cães e 2,6% (4/149) dos gatos avaliados<sup>21</sup>. Assim como, verificou-se a presença de cepas de STEC, em amostras de esfregaço retal coletadas de um cão e um gato que coabitavam o ambiente doméstico de um paciente humano, portador de SHU<sup>22</sup>. A verificação da existência de cepas de circulação comum a humanos e animais apontam a necessidade de maiores estudos para investigar o eventual papel que cães e gatos possam ter como portadores ou reservatórios da bactéria *E.coli*<sup>21, 22</sup>.

Estudos anteriores já comprovaram que *E. coli* pode, em diversos graus, sobreviver em ambientes como solo e água<sup>24, 25</sup>. Por meio da avaliação de 17 amostras, coletadas de fezes de dois adultos, de uma criança de dois anos e

de seus animais de estimação (gato e cachorro), que coabitavam o mesmo ambiente doméstico, além de esfregações ambientais (interruptores, maçanetas, tigelas de comidas dos animais, chão da lavanderia), pode-se constatar a presença de cepas de *E.coli* multirresistente tanto no ambiente quanto nos habitantes do mesmo. As correspondências fenotípicas e genotípicas encontradas nesse estudo poderiam sugerir uma transmissão interespecíes, de forma direta, por contato entre eles, ou indireta por meio do ambiente, contudo mais estudos são necessários para comprovação de tal proposição <sup>26</sup>. A transmissão domiciliar de *E.coli* também foi avaliada, por meio da análise fecal de 18 humanos e 13 cães, em oito famílias, ao longo de 6 meses. Sendo que, foram observados que dezenove clones foram compartilhados em seis das oito famílias e sete desses foram compartilhados entre humanos e cães, reforçando a possibilidade de transmissão entre espécies <sup>27</sup>. Além disso, por meio da análise sequencial do genoma completo de isolados de *E.coli* produtora de ESBL ou AmpC, de pacientes humanos portadores de ITU e seus contactantes familiares e cães, 11 de 27 domicílios avaliados possuíam pessoas (8/18) e cães (5/36) positivos para cepas de *E.coli*. Contudo, apenas em sete domicílios, a mesma cepa de *E.coli* produtora de ESBL/ AmpC, foi observada, em cinco membros da família e em dois cães de estimação, sendo que em algumas dessas residências, os cães possuíam a mesma cepa que o membro da família com ITU. Dado esse que destaca a possibilidade de transmissão da bactéria entre habitantes de um mesmo ambiente <sup>4</sup>. O possível compartilhamento de cepas de *E. coli* entre humanos e animais de estimação e entre outros animais (cães e gatos) que coabitam o mesmo ambiente domiciliar já foram sugeridos em alguns relatos anteriores <sup>6,18, 20, 27, 28</sup>.

Por meio da caracterização do padrão de resistência, produção de beta-lactamase de espectro estendido e parentesco genético de cepas multirresistentes isoladas de 134 cães, 134 proprietários e 44 pessoas sem contato com cães, houve a detecção simultânea de *E.coli* MDR em cães e seus proprietários. A observação de cepas com padrões de resistência semelhantes, genes ESBL e grupos filogenéticos idênticos entre as cepas de cães e proprietários demonstra a possibilidade de clones resistentes serem transmitidos entre pessoas e animais de estimação, no mesmo ambiente <sup>5</sup>.

A presença de fatores de virulência em isolados de animais com e sem diarreia, em estudo realizado no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, sugeriu que animais de estimação sem diarreia poderiam atuar como reservatórios para infecção por *E. coli* em humanos <sup>29</sup>.

Estes achados corroboram com a probabilidade de que cães e gatos possam ser fonte de *E. coli* para humanos. Além disso, em estudo realizado na China, por meio de um plasmídeo específico (*oqxAB*), que confere resistência bacteriana a diversos antimicrobianos, avaliado em isolados de *E. coli* de cães, gatos e humanos, reafirmou-se a possibilidade de transferência horizontal dessa característica de resistência entre portadores, podendo representar uma ameaça potencial à saúde pública <sup>30</sup>. E esse fato poderia contribuir na transmissão entre hospedeiros do patógeno, inclusive facilitar a disseminação de cepas virulentas e resistentes a antimicrobianos dentro da comunidade.

### **3 Resistência antimicrobiana**

A resistência a diversos agentes antimicrobianos tornou-se uma ameaça significativa em saúde pública, pois existem casos em que se tem disponível apenas uma ou até mesmo nenhuma opção de antimicrobiano eficaz para tratar infecção causada por essas bactérias. As bactérias podem ser definidas como multirresistentes (MDR) sendo aquelas não sensíveis a um agente pelo menos, em três ou mais categorias de antimicrobianos; extensivamente resistentes (XDR), quando não são sensíveis a pelo menos um agente em quase todas as categorias de antimicrobianos, excetuando duas ou menos; e por fim, pan-drogarresistentes (PDR), bactérias resistentes a todos os agentes em todas as categorias de antimicrobianos <sup>31</sup>.

O desenvolvimento de resistência antimicrobiana é um fenômeno natural dos microrganismos, contudo, a pressão exercida pela utilização e principalmente má utilização de agentes antimicrobianos em humanos e animais acelera esse processo <sup>32</sup>. A resistência aos antimicrobianos é um desafio para a saúde mundial que pode resultar em impactos negativos no tratamento de zoonoses bacterianas pelo fato de que pacientes com doenças causadas por bactérias resistentes necessitam de atenção especial,

medicações caras e carecem de cuidados do setor de saúde<sup>1, 10</sup>. Além disso, o uso racional de antimicrobianos na medicina veterinária e humana é um pré-requisito para o sucesso terapêutico de doenças infecciosas graves, logo, também é questão de saúde pública<sup>33, 34</sup>.

Em medicina veterinária, há uma frouxidão na venda de antimicrobianos<sup>35</sup>. Essa situação de utilização indiscriminada de antimicrobianos se agrava, frente a casos complexos, quando há incerteza sobre o diagnóstico, seleção empírica de antibióticos, preocupações com riscos de infecção secundária e pressão por parte do proprietário podendo levar a seleção e uso precipitado de agentes antimicrobianos por parte dos veterinários. Além de que a identificação bacteriana e testes de susceptibilidade bacteriana muitas vezes não são realizados, o que determina a indicação de um tratamento empírico inadequado<sup>36</sup>.

### **3.1 Importância das cepas produtoras de $\beta$ - lactamases de amplo espectro em infecções por *E. coli***

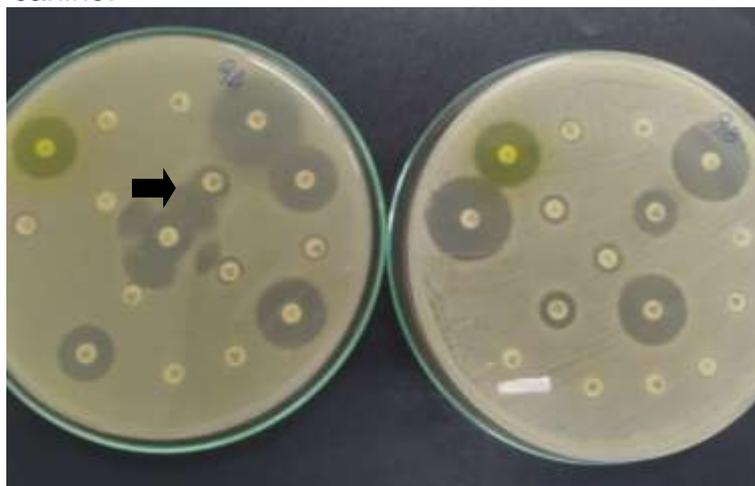
Nas últimas décadas houve o surgimento global das  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) e Enterobacteriaceae produtoras de AmpC, em humanos e animais. Sendo esse um fator de grande preocupação, pois os animais são uma possível fonte de transmissão dos genes ESBL/AmpC para humanos<sup>37</sup>.

As  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs) são enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar  $\beta$ -lactâmicos, dessa forma, inativam uma diversidade de antibióticos, e podem estar localizadas em elementos móveis como plasmídeos<sup>38, 39</sup>, transposons e integrons, que muitas vezes também carregam genes de resistência adicionais<sup>40</sup>.

As  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs) conferem resistência à maior parte dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, porém são inativadas por inibidores de  $\beta$ -lactamase, como o ácido clavulânico<sup>41</sup> (Imagem 1). Já as lactamases do tipo AmpC não são inibidas pelo ácido clavulânico e em geral, conferem resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos (com exceção da cefepima) e são inativadas pelos carbapenêmicos<sup>42</sup>. Diante disso, a eventual transferência

horizontal de genes de resistência de uma única cepa de *Escherichia coli* pode interferir no combate da infecção de diversos tipos de antibióticos, tornando a situação mais complicada para os pacientes acometidos <sup>34</sup>.

**Imagem 1** – Teste de sensibilidade antimicrobiana em placas de ágar Mueller-Hinton, em que é possível identificar fenotipicamente uma cepa ESBL (placa à esquerda), pelo teste de disco combinado, por meio da distorção do halo ao redor do disco  $\beta$ -lactâmico (amoxicilina com clavulanato de potássio) (centro da placa (➡)). E outra placa, com uma cepa multirresistente (MDR) (à direita), reconhecidas, em testes precedentes, como *Escherichia coli*, ambas de um mesmo portador canino.



Fonte: SOARES, M. S.

Os  $\beta$ -lactâmicos são um dos grupos mais importantes entre os agentes antimicrobianos em medicina veterinária, divididos em diversos grupos, dentre eles os inibidores de  $\beta$ -lactamases, penicilinas e as cefalosporinas de primeira à quarta geração <sup>40</sup>. E em grande parte das vezes, as formulações antimicrobianas são as mesmas usadas na medicina humana, inclusive os agentes de amplo espectro <sup>36</sup>.

O transporte fecal de cepas resistentes de *E.coli* em cães <sup>43- 46</sup> e em gatos <sup>47</sup> já foi observado em diversas partes do mundo. Também foi possível observar em animais de companhia isolados de Enterobacteriaceae produtoras de ESBL e/ou AmpC, entre amostras de urina de cães e gatos <sup>48</sup>.

Com intuito de reduzir a resistência antimicrobiana, a Organização Mundial da Saúde (OMS), incluiu as Enterobacteriaceae resistentes à cefalosporinas de espectro estendido na lista de patógenos de prioridade crítica global para o desenvolvimento de novos antibióticos <sup>49</sup>.

### 3.2 Fatores de risco associados a infecções por *Escherichia coli* multirresistentes

Em estudos humanos, as causas de bactérias multirresistentes, têm sido apontadas como consequência do uso generalizado e extensivo de antimicrobianos, hospitalização prolongada, exposição a dispositivos invasivos, principalmente cateteres venosos centrais, cirurgia gastrointestinal ou transplante, doenças subjacentes, gravidade da doença e idade avançada <sup>18</sup>. Além disso, em um estudo, com a participação de 399 mulheres, 98 tiveram infecção de trato urinário causada por *E.coli* multirresistente (MDR), sendo que fezes de cães, ou contato com cães foi identificado como um fator de risco para o desenvolvimento da afecção. <sup>50</sup>

Na medicina veterinária, tem ocorrido um aumento na frequência de infecções em ambientes hospitalares e isso pode estar relacionado a maior utilização, em ambientes de terapia intensiva, de antimicrobianos de última geração e períodos de internação mais prolongados <sup>27, 51, 52</sup>. A administração de diferentes antimicrobianos ao longo de anos também foi associado como possível causa da origem de cepa produtora de  $\beta$ -lactamase em um cão com infecções urinárias recorrentes <sup>53</sup>. Assim como em diversos outros estudos foi possível constatar a utilização de antimicrobianos anteriormente como um fator de risco significativo para o surgimento de bactérias resistentes a antimicrobianos <sup>54-57</sup>.

Com relação ao desenvolvimento de infecções de trato urinário, os fatores de risco são multifatoriais e dependem da interação entre virulência bacteriana e alterações na defesa do organismo <sup>58</sup>. Nas infecções de trato urinário por *E. coli*, entre os fatores de riscos relacionados são citadas defesas ineficientes do hospedeiro, paresia ou estase urinária que requeira cateterização. De maneira que, a administração de antimicrobianos durante o período de cateterismo é importante fator para o desenvolvimento de infecção de trato urinário <sup>59</sup>. O estudo retrospectivo e prospectivo realizado por Sanchez e colaboradores <sup>60</sup>, incluiu 21 isolados bacterianos de urina e feridas de cães que eram pacientes do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Geórgia (UGA-SVTH), 12 amostras ambientais da Unidade de

Terapia Intensiva e centros cirúrgicos do mesmo hospital e um isolado de cão que nunca havia sido paciente da UGA-SVTH, e por meio de metodologias biomoleculares (ERIC PCR, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e análise de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD)), foi possível identificar diversos clones de *E.coli* associados às infecções nosocomiais. Sendo que dos 21 isolados de cães, 18 possuíam o mesmo padrão de resistência à antibióticos testados, e em vários desses casos, a ITU por *E.coli* esteve associada à utilização de cateter urinário de demora e também de drenos em feridas cirúrgicas.

### 3.3 Distribuição geográfica de cepas de *E. coli* multirresistente

A prevalência de bactérias multirresistentes entre animais de estimação varia consideravelmente entre regiões. E o motivo para essa diversificação geográfica não é clara, porém provavelmente tem relação com variações locais na utilização de antimicrobianos <sup>61</sup>.

A informação sobre populações de animais de companhia é indispensável para a elaboração e proposição de medidas eficazes e necessárias para prevenir e conter os riscos as doenças zoonóticas de animais domésticos para os seus proprietários <sup>2</sup>.

Alguns relatos sobre o isolamento de *E.coli* multirresistentes são feitos em cães e gatos, pelo Mundo. Teshager e colaboradores <sup>53</sup>, em pesquisa realizada na Espanha, descreveram pela primeira vez o isolamento de uma cepa produtora de  $\beta$ -lactamase SHV-12 em um cão com infecções urinárias recorrentes. Em Roma, de 298 amostras de *E. coli* (226 cães e 72 gatos) isoladas de animais mortos, saudáveis e doentes, de diversos sítios (órgãos, fezes e conteúdo intestinal), foi possível constatar que 21 cepas (7%) eram produtoras de ESBL <sup>62</sup>. Em Portugal, amostras fecais de 75 animais de estimação saudáveis (39 cães e 36 gatos), foram testadas para ESBL e 5 (6,6%) apresentaram-se positivas <sup>63</sup>.

Na China, houve a detecção de *E. coli* e caracterização de genes ESBL em 41,3% dos 240 isolados de cães e gatos, advindos de fezes, muco nasal, esfregaços de feridas e outras fontes, tanto de animais saudáveis, quanto doentes <sup>64</sup>.

Na América do Norte, 150 amostras de *E. coli*, associadas a ITU, foram coletadas de pacientes caninos e felinos no Hospital Veterinário da Universidade da Pensilvânia. Desse total, 11 cepas foram identificadas como ESBL<sup>65</sup>. No Brasil, um estudo dirigido por Melo e colaboradores<sup>66</sup>, identificou que animais de estimação podem ser considerados reservatório de bactérias multiresistentes, de maneira que, cães de vida livre saudáveis exibiram maior prevalência de determinantes de resistência como ESBLs/ AmpC, logo poderiam ser fonte de infecção para o meio ambiente e outros animais.

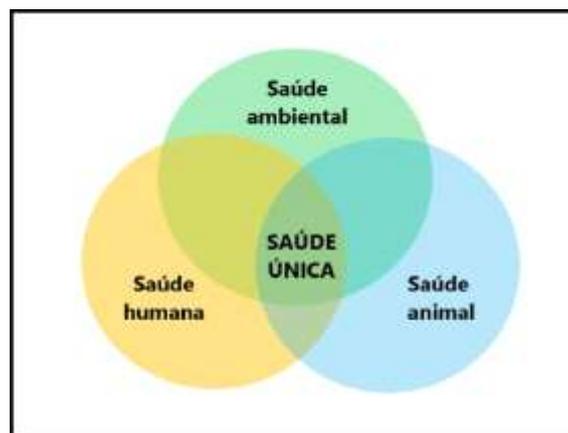
Em estudo recente realizado por Salgado-Caxito e colaboradores<sup>57</sup>, avaliou-se a prevalência global de  $\beta$ - lactamases de espectro estendido (ESBL) em infecções causadas por *E. coli*, em cães e gatos, por meio da avaliação criteriosa de artigos que foram incluídos em uma meta-análise. A variação da prevalência foi de 0,63% na Oceania, 6,21% na Europa, 6,79% na América, 7,77% na Ásia, 16,56% na África, em cães. E em gatos, de 0% na Oceania e 16,82% na Ásia, 2,48% na Europa, 8,15% na América e 7,64% na África. De maneira que a prevalência global de ESBL, estimada nesse estudo, em amostras de *E. coli* foi de 6,87% em cães e 5,04% gatos.

#### **4 Medidas profiláticas na disseminação de *Escherichia coli***

As zoonoses constituem uma séria ameaça à saúde da comunidade, e envolve a interação de humanos, outros animais e meio ambiente, sendo dessa forma, indispensável uma abordagem multissetorial para garantir medidas de controle eficazes<sup>1,67</sup>.

O aumento da percepção sobre o fato de que as doenças geralmente surgem das interações entre fatores humanos, animais e ambientais fez com que surgisse uma nova abordagem para lidar com essas questões, conhecida como Saúde Única<sup>68</sup>. 'Saúde Única' é um conceito utilizado para definir esforços colaborativos de vários profissionais em ciências de saúde, trabalhando conjuntamente para atingir a saúde ideal para pessoas, animais e o meio ambiente. E essa definição se baseia na dependência em que há entre humanos e animais e percepção de que compartilham o mesmo ambiente, sendo portando necessários esforços para controle em todos esses setores<sup>69,70,71</sup> (Figura 1).

**Figura 1** – Diagrama de Veen ilustrando os três domínios da Saúde Única.



**Fonte:** SOARES, M. S.

Além disso, frente a suspeita de resistência observada em testes de susceptibilidade, tanto veterinários, quanto proprietários devem tomar medidas para que haja a redução da propagação dessas bactérias, como higiene rigorosa das mãos e do ambiente <sup>33</sup>. As melhorias nas condições de biossegurança de pacientes animais internados conferem consequentemente segurança para veterinários, e inclusive para a comunidade, visto que há possibilidade de transporte para a mesma, por meio de pessoas colonizadas <sup>72</sup>. É também de significativa importância a utilização de diretrizes de tratamentos, restringindo o uso a alguns agentes antimicrobianos de primeira linha para evitar o surgimento de bactérias multirresistentes <sup>34, 55, 73</sup>.

A importância de dados sobre uso de antimicrobianos e resistência de bactérias em animais é crucial para que haja desenvolvimento de políticas de controle de resistência global. Dessa maneira é imprescindível o estabelecimento de programas nacionais de vigilância sanitária que possibilitarão monitorar a extensão de bactérias multirresistentes em animais de companhia e a implementação de estratégias para combater a sua disseminação, inclusive o uso prudente de antibióticos por proprietários e veterinários <sup>57</sup>.

Há poucos estudos prospectivos de base populacional sobre resistência antimicrobiana e os disponíveis são relativamente pequenos, o que coloca em evidência a importância de pesquisas futuras, principalmente pelo potencial de infecção bidirecional em humanos.

### Considerações finais

Visto a problemática apresentada, se destaca a necessidade de diretrizes nacionais de tratamento antimicrobiano veterinário, e para tanto se faz necessária vigilância rotineira por parte das autoridades locais.

Os veterinários devem sempre buscar por conhecimento para que o tratamento seja realizado da melhor forma possível, utilizando antimicrobianos apenas em casos em que haja a real necessidade<sup>58</sup>. Além disso, os médicos-veterinários devem ser fonte de informação aos proprietários de animais durante as consultas, informando sobre o manejo de animais tratados com antibióticos, explicando sobre o risco de desenvolvimento de resistência antimicrobiana para o animal e para toda família.

É necessário que sejam traçadas estratégias interdisciplinares e inovadoras em busca da Saúde Única.

### Referências

- 1) RAHMAN, T.; SOBUR, A.; ISLAM, S.; LEVY, S.; HOSSAIN, J.; EL-ZOWALATY, M. E.; RAHMAN, A. T.; ASHOUR, H. M. Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. **Microorganisms**, n. 8, v.9, p. 1-34, 2020. Disponível em: <PMCID: PMC7563794> Acessado em: 26 de julho de 2021.
- 2) DER MAATEN, T. S-V.; TURNER, D.; TILBURG, J. V.; VAARTEN, J. Benefits and Risks for People and Livestock of Keeping Companion Animals: Searching for a Healthy Balance. **Journal of Comparative Pathology**. v. 155, n. 1, p. S8-S17, 2016. Disponível em: <doi: 10.1016/j.jcpa.2015.06.007>. Acessado em 26 de julho de 2021.
- 3) CITO, F.; RIJKS, J.; RANTSIOS, A. T.; CUNNINGHAM, A. A.; BANETH, G.; GUARDABASSI, L.; KUIKEN, T.; GIOVANNINI, A. Priorization of Companion Animal Transmissible Diseases for Policy Intervention in Europe. **Journal of Comparative Pathology**. v. 155, páginas S18-S26, 2016. Disponível em: <doi: 10.1016/j.jcpa.2015.01.007>. Acessado em: 28 de julho de 2021.
- 4) TOOMBS-RUANE, L. J.; BENSCHOP, J.; FRENCH, N. P.; BIGGS, P. J.; MIDWINTER, A. C.; MARSHALL, J. C.; CHAN, M.; DRINKOVIC, D.; FAYAZ, A.; BAKER, M. G.; DOUWES, J.; ROBERTS, M. G.; BURGESS, S. A. Carriage of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- and AmpC Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli Strains from Humans and Pets in the Same Households. **American Society for Microbiology**. v. 86, n. 24,

- p. 1613-1620, 2020. Disponível: <doi: 10.1128/AEM.01613-20>. Acessado em: 29 de julho de 2021.
- 5) CARVALHO, A. C.; BARBOSA, A. V.; ARAIS, L. R.; RIBEIRO, P. F.; CARNEIRO, V. C.; CERQUEIRA, A. M. F. Resitance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of *Escherichia coli* from dogs and owners. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 47, n.1, p. 150-158, 2016. Disponível em: <doi: 10.1016/j.bjm.2015.11.005>. Acessado em: 26 de julho de 2021.
  - 6) LJUNGQUIST, O. LJUNGQUIST, D.; MYRENAS, M. RYDÉN, C.; FINN, M. BENGTSSON, B. Evidence of household transfer of ESBL-/pAmpC-producing Enterobacteriaceae between humans and dogs – a pilot study. **Infection Ecology & Epidemiology**. v. 6, p. 1 – 7, 2016. Disponível em: <doi: 10.3402/iee.v6.31514 >. Acessado em: 26 de julho de 2021.
  - 7) GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P.; SCALETISKY, I. C. A.; GUTH, B. E. C.; RODRIGUES, J. F.; PIAZZA, R. M. F.; FERREIRA, L. C. S.; MARTINEZ, M. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 47, p. 1-28, 2016. Disponível em: <doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.015>. Acessado em: 17 de maio de 2021.
  - 8) TUERENA, I.; WILLIAMNS, N. J.; NUTTAL, T.; PINCHBECK, G. Antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in hospitalised companion animals and their hospital environment. **Journal of Small Animal Practice**. v. 57, n.7, p. 339-347, 2016. Disponível em: <doi: 10.1111/jsap.12525>. Acessado em: 20 de maio de 2021
  - 9) MANGES, A. R.; GEUM, H. M.; GUO, A.; EDENS, T. J.; FIBKE, C. D.; PITOUT, J. D. D. Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 32, n.3, p. 1-25, 2019. Acessado em: 30 de abril de 2021. Disponível em: <doi: 10.1128/CMR.00135>. Acessado em: 18 de maio de 2021.
  - 10) BELANGER, L.; GARENAUX, A.; HAREL, J.; BOULIANNE, M.; NADEAU, E.; DOZOIS, C. M. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E.coli*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. V. 62, n.1, p.1-10, 2011. Disponível em:<doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00797.x>. Acessado em: 17 de maio de 2021.
  - 11) KOHLER, C. D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 301, p. 642-647, 2011. Disponível em: <doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00797.x>. Acessado em: 20 de maio de 2021.
  - 12) LECUYER, T. E.; BYRNE, B. A.; DANIELS, J. B.; DIAZ-CAMPOS, D. V.; HAMMAC, G. K.; MILLER, C. B.; BESSER, T. E.; DAVIS, M. A. Population structure and antimicrobial resistance of canine uropathogenic *Escherichia coli*. **American Society for Microbiology**. v. 56, n. 9, p. 1-12, 2018. Disponível em: <doi: 10.1128/JCM.00788-18>. Acessado: 30 de junho de 2021.

- 13) RAEISPOUR, M.; RANJBAR, R. Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**. v.7, n.118, p. 1-9, 2018. Disponível em: <doi: 10.1186 / s13756-018-0411-4>. Acessado: 20 de maio de 2021
- 14) BOURNE, J. A.; CHONG, W. L.; GORDON, D. M. Genetic structure, antimicrobial resistance and frequency of human associated *Escherichia coli* sequence types among faecal isolates from healthy dogs and cats living in Canberra, Australia. **PLOS ONE**. v. 14, n.3, p. 1-13, 2019. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0212867>. Acessado: 20 de maio de 2021.
- 15) BRYON, J. K. Urinary Tract Infection. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**. v. 49, p. 211-221, 2019. Disponível em: <doi:10.1016/j.cvsm.2018.11.005>. Acessado: 14 de outubro de 2021.
- 16) LIEN, C-J.; WANG, S-L. Antimicrobial resistance of common uropathogens from cats with urinary tract infections in a veterinary teaching hospital in Taiwan. **Taiwan Veterinary Journal**. v. 46, n. 1, p.21-28, 2020. Disponível em: <doi: 10.1142/S168264852050002X> Acessado: 20 de maio de 2021.
- 17) VILA, J.; SÁEZ-LÓPEZ, E.; JOHNSON, J. R.; ROMLING, R.; DOBRINDT, U.; CANTÓN, R.; GISKE, C. G.; NAAS, T.; CARATTOLI, A.; MARTÍNEZ-MEDINA, M.; BOSCH, J.; RETAMAR, P.; RODRÍGUEZ-BANO, J.; BAQUERO, F.; SORO, S. M. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 40, n.4, p. 437-463, 2016. Disponível em: <doi: 10.1093/femsre/fuw005>. Acessado em: 20 de maio de 2021.
- 18) POMBA, C.; RANTALA, M.; GREKO, C.; BAPTISTE, K. E.; CATRY, B.; DUIJKEREN, E. V.; MATEUS, A.; MORENO, M. A.; PYORALA, S.; RAZAUSKAS, M.; SANDERS, P.; TEALE, C.; THRELFALL, E. J.; KUNSAGI, Z.; TORREN-EDO, J.; JUKES, H.; TORNEKE, K. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 72, n.4, p. 957 -968, 2017. Disponível em: <doi: 10.1093/jac/dkw481>. Acessado em: 20 de maio de 2021.
- 19) ABBAS, G.; KHAN, I.; MOHSIN, M.; SAJJAD-UR-RAHMAN.; YOUNAS, T.; ALI, S. High rates of CTX-M group-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Escherichia coli* from pets and their owners in Faisalabad, Pakistan. **Infection and Drug Resistance**. v.12, p. 571 – 578, 2019. Disponível em:<doi: 10.2147 / IDR.S189884>. Acessado em: 20 de maio de 2021.
- 20) FLAMENT-SIMON, S-C.; TORO, M.; GARCÍA, V.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; ALONSO, M. P.; GOICOA, A.; DÍAZ-GONZÁLEZ, J.; NICOLAS-CHANOINE, M-H.; BLANCO, J. Molecular Characteristics of Extraintestinal Pathogenic *E.coli* (ExPEC), Uropathogenic *E.coli* Isolated from Healthy Dogs in Spain. Whole Genome Sequencing of Canine ST372 Isolates and Comparison with Human Isolates Causing Extraintestinal

- Infections. **Microorganisms**. v.8, n.11, p. 1-25, 2020. Disponível em:<doi: 10.3390 / microorganismos8111712>. Acessado em: 20 de maio de 2021.
- 21) FOX, T. C.; CLABOTS, C.; PORTER, S. B.; BENDER, T.; THURAS, P.; COLPAN, A.; BOETTCHER, K. ; JOHNSON, J. R. Bacterial “Virulence” Traits and Host Demographics Predict *Escherichia coli* Colonization Behaviors Within Households. **Open Forum Infectious Diseases**. v. 7, n. 11, p. 1-9, 2020. Disponível em: <doi: 10.1093/ofid/ofaa495>. Acessado em: 20 de maio de 2021.
  - 22) BENTACOR, A.B.; RUMI, M. V.; GENTILI, M. V.; SARDOY, C.; IRINO, K.; AGOSTINI, A.; CARALDI, A. Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high Hemolytic Uremic Syndrome incidence region in Argentina. **FEMS Microbiol Lett**. v. 267, p. 251 – 256, 2007. Disponível em: <doi: 10.1111 / j.1574-6968.2006.00569.x> Acessado: 14 de outubro de 2021.
  - 23) RUMI, M. V.; IRINO, K.; DEZA, N.; HUGUET, M. J.; BENTANCOR, A. B. First Isolation in Argentina of a highly virulence Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145:NM from a domestic cat. **The Journal of Infection in Developing Countries**. v. 6, n. 4, p. 358 - 363, 2012. Disponível em: < 10.3855 / jidc.2225>. Acessado: 14 de outubro de 2021.
  - 24) ROYDEN, A.; ORMANDY, E.; PINCHBECK, G.; PASCOE, B.; HITCHINGS, M. D.; SHEPPARD, S. K.; WILLIAMS, N. J. Prevalence of faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) – producing *Escherichia coli* in veterinary hospitalar staff and students. **Veterinary Record Open**. v..6, n.1, 2019. Disponível em: <doi: 10.1136/vetreco-2018-000307>. Acessado em: 17 de maio de 2021.
  - 25) JANG, J.; HUR, H. –G.; SADOWSKY, M. J.; BYAPPANAHALLI, M. N.; YAN, T.; ISHII, S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications – a review – **Journal of Applied Microbiology**. n 123, p. 570-581, 2017. Disponível em: <doi: 10.1111/jam.13468>. Acessado em: 14 de julho de 2021
  - 26) MARTINS, L. R. L.; PINA, S. M. R.; SIMÕES, R. L. R.; MATOS, A. J. F.; RODRIGUES, P.; COSTA, P. M. R.; SALAZAR, A. Common Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance Patterns Found in a Case Study of Multiresistant *E.coli* from Cohabitant Pets, Humans, ADN Household Surfaces. **Journal of Environmental Health**. sl., v.75, n. 6, p. 74-81, 2013. Disponível em: <PMID:23397653> . Acessado em: 14 de outubro de 2021.
  - 27) DAMBORD, P.; NIELSEN, S. S.; GUARDABASSI, L. *Escherichia coli* shedding patterns in humans and dogs: insights into within-household transmission of phylotypes associated with urinary tract infections. **Epidemiology & Infection**. v. 137, n. 10, p. 1-17 , 2009.
  - 28) KAINDAMA, L.; JENKINS, C.; AIRD, H.; JORGENSEN, F.; STOKER, K.; BYRNE, L. A cluster of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 highlights raw pet food as an emerging potencial source of infection in humans. **Epidemiology and Infection**. v. 149, p. 1-5, 2021.

- 29) PUÑO-SAMIENTO, J.; MEDEIROS, L.; CHICONI, C.; MARTINS, F.; PELAYO, J.; ROCHA, S.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; ZANUTTO, M.; KOBAYASHI, R.; NAKAZATO, G. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. **Veterinary Microbiology**. v. 166, v.3-4, p.676 – 680, 2013. Disponível em: <doi: 10.1016/j.vetmic.2013.07.007> Acessado: 28 de julho de 2021.
- 30) LIU, B.; WU, H.; ZHAI, Y.; HE, Z.; SUN, H.; CAI, T.; HE, D.; LIU, J.; WANG, S.; PAN, Y.; YUAN, L.; HU, G. Prevalence and molecular characterization of oqxAB in clinical *Escherichia coli* isolates from companion animals and humans in Henan Province, China. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 18, p. 1-9, 2018. Disponível em: <doi: 10.1128/AAC.00139-10>. Acessado em: 26 de julho de 2021.
- 31) MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, U.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALARGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 18, n. 3, p. 268- 281, 2011. Disponível em: <doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>. Acessado em: 20 de maio de 2021.
- 32) World Health Organization (WHO). Antibacterial agents in clinical and preclinical development – an overview and analysis. Geneva: **World Health Organization**. p.1-76, 2020. <<https://www.who.int/library>> Acessado em: 01 de julho de 2021.
- 33) MARQUES, C.; BELAS, A.; FRANCO, A.; ABOIM, C.; GAMA, L. T.; POMBA, C. Increase in antimicrobial resistance and emergence of major international high-risk clonal lineages in dogs and cats with urinary tract infection: 16 year retrospective study. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 73, n.2, p. 377-384, 2018. Disponível: <doi:10.1093/jac/dkx401> Acessado em: 20 de maio de 2021.
- 34) PUVACA, N.; FRUTO, R. L. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans and Pet Animals. **Antibiotics** v. 10, n. 69, paginas 1-19, 2021. Disponível em: <doi: 10.3390/antibiotics10010069>. Acessado em: 01 de julho de 2021.
- 35) GARCIA, J. F.; DIEZ, M. J.; SAHAGUN, A. M.; DIEZ, R.; SIERRA, M.; GARCIA, J. J.; FERNANDEZ, M. N. The online sale of antibiotics for veterinary use. **Animals**. v. 10, n.3, p. 1-14, 2020. Disponível em: <doi: 10.3390/ani10030503>. Acessado em: 28 de julho de 2021.
- 36) GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 54, n.2, p. 321-332, 2004. Disponível em: <doi: 10.1093/jac/dkh332>. Acessado em: 17 de maio de 2021.

- 37) MADEC, J, -Y; HAENNI, M.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase/AmpC – and carbapenemase –producing Enterobacteriaceae in animals: a threat of humans? **Clinical Microbiology and Infection**. v. 23, p. 826-833, 2017. Disponível em: 10.1016/j.cmi.2017.01.013. Acessado em: 23 de julho de 2021.
- 38) ASLANTAS, O.; YILMAZ, E. S. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and plasmidic AmpC  $\beta$ -lactamase (pAmpC) producing Escherichia coli indogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v. 79, n. 6, p. 1024-1030, 2017. Disponível em: <doi: 10.1292/jvms.16-0432>. Acessado em: 17 de maio de 2021.
- 39) HUANG, Y-H.; KUAN, N-L.; YEH, K-S. Characteristics of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing Escherichia coli From Dog and Cats Admitted to a Veterinary Teaching Hospital in Taipei, Taiwan From 2014 to 2017. **Frontiers in Veterinary Science**. v. 7, n. 395, p. 1-9, 2020. Disponível em: <doi: 10.3389/fvets.2020.00395> Acessado em: 17 de maio de 2021.
- 40) SMET, A.; MARTEL, A.; PERSOONS, D.; DEWULF, J.; HEYNDRICKX, M.; HERMAN, L.; HAESEBROUCK, F.; BUTAYE, P. Broad-spectrum  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. **FEMS Microbiological Reviews**. v. 34, n.3, p. 295-316, 2010. Disponível em:<doi: 10.1111 / j.1574-6976.2009.00198.x>. Acessado em: 23 de julho de 2021.
- 41) CASTANHEIRA, M.; SIMNER, P. J.; BRADFORD, P. A. Extended-spectrum  $\beta$ - lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. **JAC Antimicrobial Resistance**. .v. 3, n.3, p.1-38. 2021. Disponível em: <doi: 10.1093/jacamr/dlab092>. Acessado em: 28 de julho de 2021.
- 42) BOMONO, R. A.  $\beta$ - Lactamases: A Focus on Current Challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v. 7, n.1, p. 1-15, 2017. Disponível em: < doi:10.1101/cshperspect.a025239>. Acessado em: 23 de julho de 2021.
- 43) ZHANG, P. L. C.; SHEN, X.; CHALMERS, G.; REID-SMITH, R. J.; SLAVIC, D.; DICK, H.; BOERLIN, P. Prevalence and mechanisms of extended-spectrum cephalosporin resistance in clinical and fecal Enterobacteriaceae isolates from dogs in Ontario, Canada. **Veterinary Microbiology**. v. 213, p. 82-88, 2018. Disponível em: <doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.020> Acessado em: 23 de julho de 2021.
- 44) RUSDI, B.; LAIRD, T.; ABRAHAM, R.; ASH, A.; ROBERTSON, I. D.; MUKERJI, S.; COOMBS, G. W.; ABRAHAM, S.; O'DEA, M. A. Carriage of critically importante antimicrobial resitant bacteria and zoonotic parasites amongst camp dogs in remote Western Australian indigenous communities. **Scientific Reports**. v 8, n. 8725, p.1-8, 2018. Disponível em: <doi:10.1038/s41598-018-26920-5>. Acessado em: 20 de maio de 2021.

- 45) ORTEGA-PAREDES, D.; HARO, M.; LEORO-GARZÓN, P. BARBA, P.; MORA, F.; FORS, M.; VINUEZA-BURGPS, C.; FERNÁNDEZ-MOREIRA, E. Multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from canine faeces in a public part in Quito, Ecuador. **Journal Global Antimicrobial Resistance**. v. 18, p. 263-268, 2019. Disponível em: <doi: 10.1016/j.jgar.2019.04.002>. Acessado em: 20 de maio de 2021.
- 46) SALGADO-CAXITO, M.; BENAVIDES, J.A.; ADELL, AIKO. D.; PAES, A. C.; MORENO-SWITT, A. I. Global prevalence and molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing- *Escherichia coli* in dogs and cats – A scoping review and meta-analysis. **One Health**. v. 12, p.1-15, 2021. Disponível em: <doi: 10.1016/j.onehlt.2021.100236> Acessado em: 14 de julho.
- 47) PEPIN-PUGET, L.; GARCH, F. E.; BERTRAND, X.; VALOT, B.; HOCQUET, D. Genome analysis of enterobacteriaceae with non-wild type susceptibility to third-generation cephalosporins recovered from diseased dogs and cats in Europe. **Veterinary Microbiology**. v. 242, p. 1-6, 2020. Disponível em: <doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108601>. Acessado em: 14 de julho de 2021.
- 48) MAEYAMA, Y.; TANIGUCHI, Y.; HAYASHI, W.; OHSAKI, Y.; OSAKA, S.; KOIDE, S.; TAMAI, K.; NAGANO, Y.; ARAKAWA, Y.; NAGANO, N. Prevalence of ESBL/AmpC genes and specific clones among the third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae from canine and felina clinica specimens in Japan. **Veterinary Microbiology**. v. 216, p. 183-189, 2018. Disponível: <doi: 10.1016/j.vetmic.2018.02.020>. Acessado em: 19 de junho de 2021.
- 49) World Health Organization (WHO). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Reserarch, Discovery, and Development of New Antibiotics. **Genebra: Who Press**, p. 1-7, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/library>. Acessado em: 1 de julho de 2021.
- 50) UKAH, U. C.; GLASS, M.; AVERY, B.; DAIGNAULT, D.; MULVEY, M. R.; REID-SMITH, R. J.; PARMLEY, E. J.; PORTT, A.; BOERLIN, P.; MANGES, A. R. Risk factors for acquisition of multidrug-resistan *Escherichia coli* and development of Community-acquired urinary tract infections. **Epidemiology and Infection**. v. 146, n.1, p.46-57, 2018. Disponível em: <doi: 10.1017/S0950268817002680>. Acessado em: 14 de junho de 2021.
- 51) DAZIO, V.; NIGG, A.; SCHMIDT, J. S.; BRILHANTE, M.; MAURI, N.; KUSTER, S. P.; BRAWAND, S. G.; SCHUPBACH-REGULA, G.; WILLI, B.; ENDIMIANI, A.; PERRETEN, V.; SCHULLER, S. Acquisition and carriage of multidrug-resistant organisms in dogs and cats presented to small animal practices and clinics in Switzerland. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 35, n.2, p. 970-979, 2021. Disponível em: <doi: 10.1111/jvim.16038>. Acessado em: 17 de maio de 2021.
- 52) HUTTON, T. A.; INNES, G. K.; HAREL, J.; GARNEAU, P.; CUCCHIARA, A.; SCHIFFERLI, D. M.; RANKIN, S. C. Phylogroup and virulence gene

- association with clinical characteristics of *Escherichia coli* urinary tract infections from dogs and cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 30, n. 1, p. 64-70, 2018. Disponível em: <doi: 10.1177/1040638717729395>. Acessado em: 14 de junho de 2021.
- 53) TESHAGER, T.; DOMINGUEZ, L.; MORENO, M. A.; SAÉNZ, Y.; TORRES, C.; CARDEÑOSA, S. Isolation of an SHV- 12 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain from dog with recurrent urinary tract infections. **Antimicrobial agentes and chemotherapy**. v. 44, n. 12, p. 3483- 3484, 2000. Disponível em: <doi:10.1128/AAC.44.12.3483-3484.2000>. Acessado em: 14 de junho de 2021.
- 54) RIJKS, J. M.; CITO, F.; CUNNINGHAM, A. A.; RANTISIOS, A. T.; GIOVANNINI, A. Disease Risk Assessments Involving Companion Animals: an Overview for 15 Selected Pathogens Taking a European Perspective. **Journal of Comparative Pathology**. v.155, n.1, p.S75 – S97, 2016. Disponível em: <doi: 10.1016/j.jcpa.2015.08.003> Acessado em: 19 de junho de 2021.
- 55) SAPUTRA, S.; JORDAN, D.; MITCHELL, T.; WONG, H. S.; ABRAHAM, R. J.; KIDSLEY, A.; TURNIDGE, J.; TROTT, D. J.; ABRAHAM, S. Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolated from companion animals in Australia. **Veterinary Microbiology**. v. 211, p. 43-50, 2017. Disponível em: <doi: 10.1016/j.vetmic.2017.09.014>. Acessado em: 14 de junho de 2021.
- 56) KARKABA, A.; HILL, K.; BENSCHOP, J.; PLEYDELL, E.; GRINBERG, A. Carriage and population genetics of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* in cats and dogs in New Zealand. **Veterinary Microbiology**. v. 233, paginas 61-67, 2019. Disponível em: <doi: 10.1016/j.vetmic.2019.04.015>. Acessado em: 01 de junho de 2021.
- 57) SALGADO-CAXITO, M.; BENAVIDES, J. A.; MUNITA, J. M.; RIVAS, L.; GARCÍA, P.; LISTONI, F. J. P.; MORENO-SWITT, A. I.; PAES, A. C. Risk factors associated with faecal carriage of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* among dogs in Southeast Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 190, paginas 1- 8, 2021. Disponível em: <doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105316>. Acessado em: 01 de junho de 2021.
- 58) WEESE, J. S.; BLONDEAU, J.; BOOTHE, D.; GUARDABASSI, L. G.; GUMLEY, N.; PAPICH, M.; JESSEN, L. R.; LAPPIN, M.; RANKIN, S.; WESTROPP, J. L.; SYKES, J. International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID) guidelines for the diagnosis and management of bacterial urinary tract infections in dogs and cats. The **Veterinary Journal**. v. 247, p. 8-25, 2019. Disponível em: <doi: 10.1016/j.tvjl.2019.02.008> Acessado em: 28 de julho de 2021.
- 59) GIBSON, J. S.; MORTON, J. M. COBBOLD, R. N.; SIDJABAT, H. E.; FILIPPICH, L. J.; TROTT, D. J. Multidrug-Resistant *E.coli* and *Enterobacter* Extraintestinal Infection in 37 Dogs. **Journal Veterinary Internal**

- Medicine.**, v. 22, p. 844-850, 2008. Disponível em: <10.1111/j.1939-1676.2008.00124.x>. Acessado em: 28 de julho de 2021.
- 60) SANCHEZ, S.; STEVENSON, M. A. M.; HUDSON, C. R.; MAIER, M.; BUFFINGTON, T.; DAM, Q.; MAURER, J. J. Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates Associated with Nosocomial Infections in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 10, p. 3586 – 3595, 2002. Disponível em: <doi: 10.1128/JCM.40.10.3586-3595.2002>. Acessado em: 01 de julho de 2021.
- 61) DAMBORD, P.; BROENS, E. M.; CHOMEL, B. B.; GUENTHER, S.; PASMANS, F.; WAGENAAR, J. A.; WEESE, J. S.; WIELER, L. H.; WINDAHL, U.; VANROMPAY, D.; GUARDABASSI, L. Bacterial Zoonoses Transmitted by Household Pets: State-of-the-Art and Future Perspectives for Targeted Research and Policy Actions. **Journal of Comparative Pathology**, v. 155, n. 1, p.1-14, 2015. Disponível: <doi: 10.1016/j.jcpa.2015.03.004.> Acessado em: 29 de julho de 2021.
- 62) CARATTOLI, A.; LOVARI, S.; FRANCO, A.; CORDARO, G.; MATTEO, P. D.; BATTISTI, A. Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* Isolated from Dogs and Cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.49, n. 2, p. 833-835, 2005. Disponível em: <doi: 10.1128/AAC.49.2.833-835.2005>. Acessado em: 28 de julho de 2021.
- 63) Costa D, Poeta P, Briñas L, Sáenz Y, Rodrigues J, Torres C. Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54(5): 960-961. Disponível em: <doi:10.1093/jac/dkh444>. Acessado em 28 de julho de 2021.
- 64) Sun Y.; Zeng, z.; Chen, s.; Ma, j.; He, L.; Liu, Y. Deng, Y.; Lei, T.; Zhao, J.; Liu, J-H.. High prevalence of bla (CTX-M) extended-espectrum  $\beta$ -lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 16, n.9, p. 1475 -1481. <doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03127.x>. Acessado em 19 de junho de 2021.
- 65) O'KEEFE, A.; HUTTON, T. A.; SHIFFERLI, D. M.; RANKIN, S. C. First Detection of CTX-M and SHV Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* Urinary Tract Isolates from Dogs and Cats in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3489-3492, 2010. Disponível em: <doi: 10.1128/AAC.01701-09>. Acessado em: 19 de junho de 2021.
- 66) MELO, L. C.; ORESCO, C.; LEIGUE, L.; NETTO, H. N.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R.; SARAS, E.; HAENNI, M.; LINCOPAN, N.; MADEC, J. Y. Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-producing Enterobacteriaceae in healthy and diseased companion animals in Brazil. **Veterinary Microbiology**. v. 221, p. 59-66, 2018. Disponível em: <doi:10.1016/j.vetmic.2018.05.017>. Acessado: 1 de julho de 2021.

- 67) TORRES, A. G. *Escherichia coli* diseases in Latin America – a ‘One Health’ multidisciplinary approach. **Pathogens and Disease**. v. 75, n.2, p. 1-7, 2017. Disponível: <10.1093/femspd/ftx012>. Acessado em: 29 de junho de 2021.
- 68) DAVIS, M. F.; RANKIN, S. C.; SCHURER, J. M.; COLE, S.; CONTI, L.; RABINOWITZ, P.; GAY, G.; KAHN, L.; MACHALABA, C.; MAZET, J.; PAPPAIOANOU, M.; SANGEANT, J.; TROMPSON, A.; WEESE, S.; ZINNSTAG, J. Checklist for One Health Epidemiological Reporting of Evidence (COHERE). **One Health**. v. 4. p. 14-21, 2017. Disponível em: <doi: 10.1016/j.onehlt.2017.07.001>. Acessado em: 20 de maio de 2021.
- 69) MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiology Spectrum**. v. 6, n. 2, p. 1 -26, 2017. Disponível: < 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>. Acessado em: 1 de julho de 2021.
- 70) CHUA, A. Q.; KWA, A. L-H.; TAN, T. Y.; LEGIDO-QUIGLEY, H.; HSU, L. Y. Ten-year narrative review on antimicrobial resistance in Singapore. **Singapore Medical Journal**. v. 60, n. 8, p. 387-396, 2019. Disponível em: <doi: 10.11622/smedj.2019088>. Acessado em: 20 de maio de 2021.
- 71) VALAT, C.; DRAPEAU, A.; BEURLET, S.; BACHY, V.; BOULOUIS, H-J.; PIN, R.; CAZEAU, G.; MADEC, J-Y.; HAENNI, M. Pathogenic *Escherichia coli* in Dog Reveals the Predominance of ST372 and the Human-Associated ST73 Extra-Intestinal Lineages. **Frontiers in Microbiology**. v.11, n. 580, p. 1-12, 2020. Disponível em: <doi: 10.3389/fmicb.2020.00580>. Acessado em: 26 de maio de 2021.
- 72) WALTHER, B.; TEDIN, K.; A. LUBKE-BECKER. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. **Veterinary Microbiology**. v. 200, p. 71-78, 2017. Disponível em: <doi: 10.1016/j.vetmic.2016.05.017>. Acessado em: 26 de maio de 2021.
- 73) DORSCH, R.; TEICHMANN-KNORRN, S.; LUND, H. S. Urinary tract infection and subclinical bacteriuria in cats: A clinical update. **Journal of Feline Medicina and Surgery**. v. 21, n. 11, p. 1023-1038, 2019. Disponível em: <doi: 10.1177/1098612X19880435>. Acessado em 20 de maio de 2021.

**CAPÍTULO 4 – CANINE PANCREATIC MALIGNANT  
GASTRINOMA ASSOCIATED WITH HYPOGLYCAEMIA  
AND HYPERINSULINEMIA: CASE REPORT**

**Canine pancreatic malignant gastrinoma associated with hypoglycaemia and hyperinsulinemia: case report**

M. T. SOARES\*<sup>1</sup>; L. PADOVANI<sup>2</sup>; NÓBREGA, D. F.<sup>3</sup>; G. W. DI SANTIS<sup>4</sup>; M. S. ZANUTTO<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Mestranda em Clínicas Veterinárias - Universidade Estadual de Londrina - UEL - Londrina, PR; mirella.tomaz.soares@uel.br – ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7963-6228>

<sup>2</sup> Clínica autônoma – Londrina, PR – ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6197-5205>

<sup>3</sup> Laboratório de Patologia Veterinária – Pat Animal – São José do Rio Preto, SP – ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3670-3694>

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina – UEL – Londrina, PR. – ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9688-7181>

<sup>4</sup> Departamento de Clínicas Veterinárias – Universidade Estadual de Londrina – UEL – Londrina, PR – ORCID: 0000-0003-0880-4524

## **ABSTRACT**

Gastrinoma is a rare neuroendocrine tumor originated from the malignant transformation of the delta cells of the pancreatic islet, resulting in hypergastrinemia and consequently gastric ulcers. The present work describes a case of gastrinoma identified postmortem through immunohistochemistry. However, there was no suspicion of such disease ante-mortem, as signs of neuroglycopenia associated with the combined dosage of glycemia and insulinemia were highly suggestive of insulinoma. Thus, the treatment was directed towards the clinical suspicion of greater evidence. Throughout this case report, characteristics of neoplasia diagnosed by means of immunohistochemistry are described, and comparisons are made to reports both in veterinary medicine and in human medicine.

Keywords: pancreatic tumor, dog, Zollinger-Ellison syndrome.

## **INTRODUCTION**

Gastrinomas are rare neuroendocrine tumors cells of the pancreatic islet, which were first described in human medicine in 1955 by Zollinger-Ellison (Zollinger and Ellison, 1955). This neoplasm of the endocrine pancreas is a consequence of the predominantly malignant transformation of somatostatin-secreting delta cells into

gastrin-secreting cells (Pascon and Mistieri, 2016). This disorder is also known as Zollinger-Ellison syndrome characterized by the triad: (1) gastrin hypersecretion, (2) stimulation of hydrochloric acid release resulting in (3) esophageal and gastroduodenal ulcerations (Hughes, 2006; Metz, 2012). In dogs, homologous cases of Zollinger-Ellison Syndrome are few, being described as main clinical manifestations diarrhea, vomiting, apathy, anorexia and lethargy (Hughes, 2006).

Diagnosis is based on clinical signs in association with complementary tests, mainly from hypergastrinemia in fasting patients, together with exploratory laparotomy and tumor resection, with subsequent histopathological and immunohistochemical evaluation (Hughes, 2006).

Medical treatments for this syndrome are based on the administration of gastric acid secretion inhibitors (proton pump inhibitors and H<sub>2</sub> blockers), gastroprotectants (misoprostol and sucralfate) and somatostatin analogues (octreotide) to inhibit gastrin secretion. Surgical treatment, on the other hand, includes resection of the neoplasm, but this may not be curative due to the likelihood of undiagnosed metastases at the time of surgery (Hughes, 2006).

Taking into consideration the rarity of this affection, a case of pancreatic malignant gastrinoma in a dog is reported in this study, focusing on its clinical peculiarities and pathological aspects.

## **CASE REPORT**

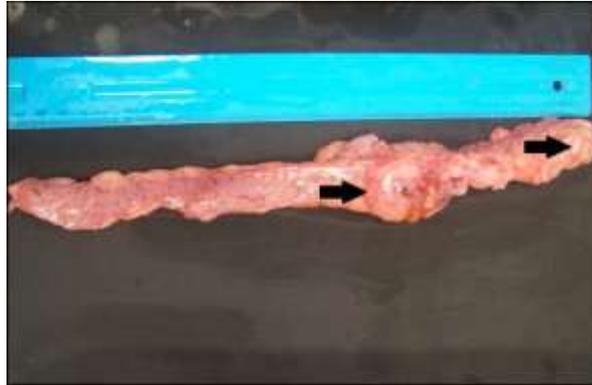
A female Rottweiler, 9 years old, 32.3 kg, not neutered, was treated at the Emergency Room of the Veterinary Hospital of the University State of Londrina, in June 2014, with a history of fainting and acute tremors, in addition to episodes of intermittent emesis dating approximately 30 days. On physical examination, the animal had a low-grade fever (39.4°C), on palpation an abdominal mass was found in the mesogastric region; focal seizure, with ear and eyelid movements and punctate miosis. The initial blood count identified only mild thrombocytosis of 693,000/ul (reference range 180,000-680,000/ul). Serum biochemistry revealed mild hyperphosphatemia: alkaline phosphatase (AF) of 167 U/L (reference range: 20-156 U/L), hypoglycemia of 30 mg/dL (reference value > 65 mg/dL), and alanine aminotransferase (ALT), urea and creatinine were within normal range. At that time, the patient was stabilized by slow intravenous administration of 5 ml of 50% glucose over 10 minutes, and then therapy

with supplemented fluid therapy (Ringer Lactate with 50% glucose), enrofloxacin (Chemitril®, 5 mg/kg, SC, BID) and ranitidine (2 mg/kg, SC, TID). During the hospital admission period, the patient presented persistent hypoglycemia, even after glucose administration. After being hospitalized for 3 days and with suspected insulinoma, the patient returned after a week, whilst fasting, for insulin measurement by radioimmunoassay (BET Laboratories - RJ), which revealed a concentration of 61.89 IU/ml (reference value of 5-25 IU/ml) of insulin, when hypoglycemia was 28 mg/dL. Therefore, given the facts, the clinical suspicion was of insulinoma, to which home therapy with 0.5 mg/kg prednisone, orally, was instituted every 12 hours, until further recommendations.

After 11 days, the owner reported that the animal was still presenting episodes of emesis, but its appetite was preserved. As therapy prednisone was still being administered. During this period, a complete blood count was performed, which revealed mild microcytic, hypochromic anemia, with a hematocrit of 33% (reference value: 38% to 47%), leukocytosis of 45,800/ $\mu$ L (reference value: 6,000 - 17,000/ $\mu$ L), with 2290/ $\mu$ L of rods (reference value: 0-200/ $\mu$ L), neutrophilicity of 41.220/ $\mu$ L (reference value: 3,000-11,500/ $\mu$ L). Regarding the biochemical tests, glucose, total protein and creatinine were within the reference values. Abdominal ultrasound was performed and the presence of hypoechoic hepatic nodules, enlargement of peri-pancreatic lymph nodes, hyperechoic pancreatic region, and renal signs suggestive of chronic pyelonephritis were observed. Therefore, in addition to the administration of corticosteroids, an association of sulfamethoxazole and trimethoprim 30 mg/kg, orally, every 12 hours, and ranitidine 2 mg/kg, orally, every 8 hours, for 21 days, were prescribed.

The animal was followed up with serum glucose dosages for approximately 5 months and during this period there was stabilization of blood glucose (without hypoglycemic peaks) and reduction in the dose of prednisone due to frequent episodes of emesis and darkened diarrhea, when euthanasia was then chosen in function of cachexia, emesis and anorexia. In the last hemogram performed, microcytic, hypochromic anemia was observed, with hematocrit of 26% and leukocytosis of 44,200/ $\mu$ L, with neutrophilia of 43,758/ $\mu$ L, alanine transferase and alkaline phosphatase were found to be increased (respectively 667 U/L and 778 U/ $\mu$ L), hypoproteinemia (3.7 g/dL) and normal creatinine.

At necropsy, the main findings were the presence of two neoformations in the pancreas (Figure 1), increased volume of the peri-pancreatic lymph node and multiple nodules in the liver. Such lesions were sampled for histopathological examination.

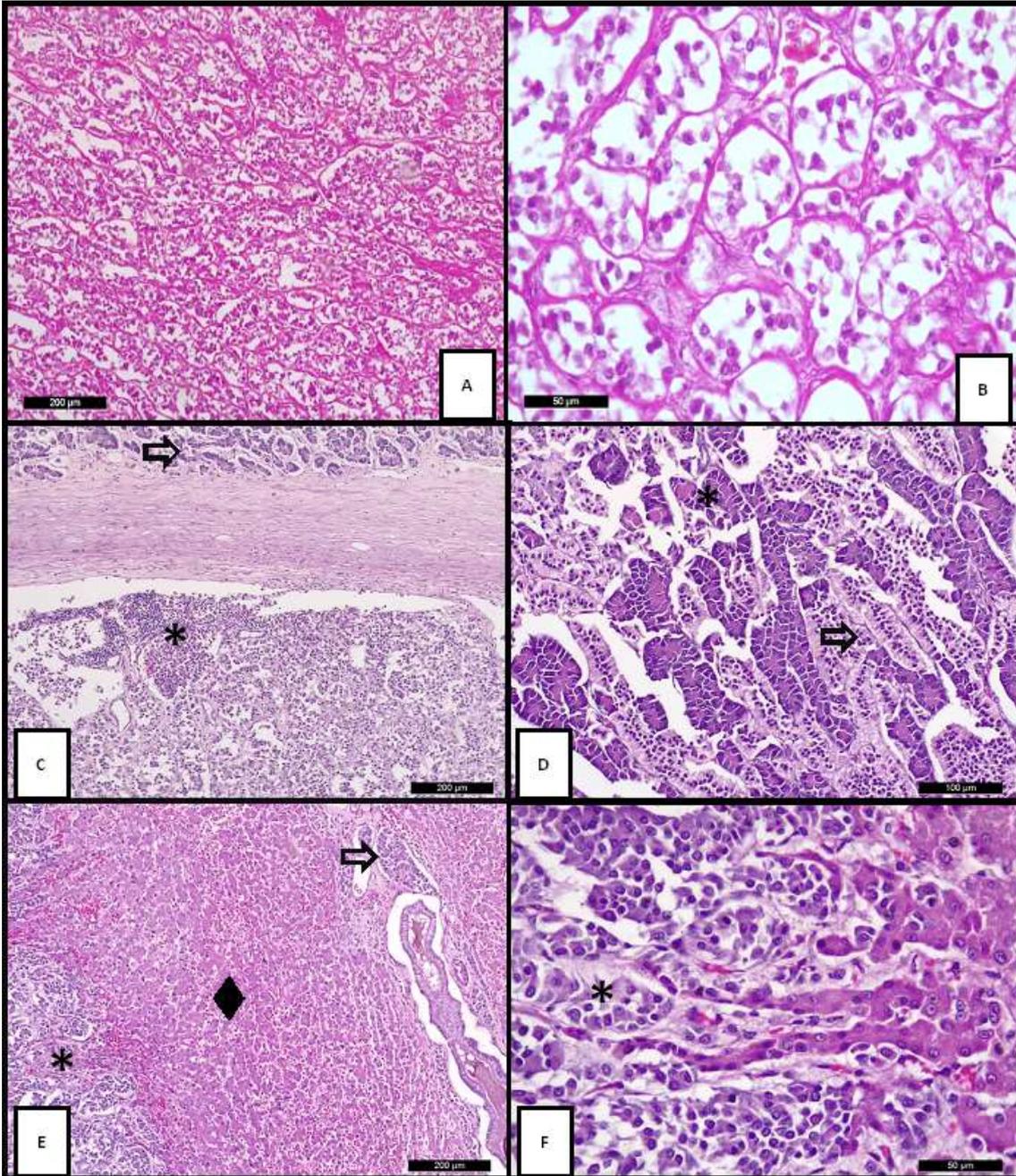


**Figure 1.** Nodules in pancreas indicated by arrows.

Microscopically, the pancreatic lesion is characterized by a partially delimited and expansive neoformation. Cells are arranged in loosely cohesive nests surrounded by delicate fibrovascular tissue (Figure 2A). Such cells are small, round to polygonal, with eosinophilic cytoplasm, mildly granular, with round nuclei, containing delicate granular chromatin and eventually a small nucleolus (Figure 2B). In the adjacent parenchyma, intermingled with the exocrine acini, there is trabecular expansion of columnar cells, with clear eosinophilic cytoplasm, slightly granular, round, small and hyperchromatic nuclei, with finely granular chromatin (Figure 2D). Representing foci of pancreatic islet cell hyperplasia, considering the morphological aspect, however, it was not submitted to immunohistochemical analysis. Due to the time elapsed between death and necropsy, autolysis is noted in the material, which is more evident in pancreatic lesions due to its proximity to the intestine.

In the peripancreatic lymph node, there is loss of the normal architectural pattern due to the expansion of cortical and medullary sinuses, with the presence of neoplastic cells with characteristics similar to those observed in pancreatic neoformation (Figure 2C).

The fragment from one of the areas of neoformation in the liver parenchyma, microscopically, contains neoplastic emboli in portal lymphatic vessels (Figure 2E) and invasive neoplastic infiltration dissecting the cords of hepatocytes, whose cells present an oncocytic pattern similar to that seen in pancreas (Figure 2F).



**Figure 2.** Dog, Digital photomicrograph. A) Pancreatic neof ormation. Architectural aspect of the lesion composed of nests of cells with low cohesion surrounded by a thin fibrovascular stroma. Hematoxylin and eosin. B) Pancreatic neof ormation. Round to polygonal cells, small, with eosinophilic cytoplasm, slightly granular, round nuclei, containing delicate granular chromatin (a “salt and pepper” appearance) and an occasional single, small nucleolus. Hematoxylin and eosin. C) Peripancreatic lymph node. Transition between pancreas (⇒) and peripancreatic lymph node in which there is a shortage of lymphoid tissue (\*) and great neoplastic proliferation in loose nests of round cells, with eosinophilic cytoplasm, round and hyperchromatic nuclei. Hematoxylin and eosin. D) Pancreas. Columnar cell trabecula (⇒) with clear eosinophilic cytoplasm, round, small and hyperchromatic nuclei, interspersed with exocrine pancreatic acini (\*). Hematoxylin and eosin. E) Neoplastic infiltration in liver (\*), preserved liver parenchyma area (♦) and portal tract with presence of neoplastic emboli in lymphatic vessels (⇒). Hematoxylin and eosin. F) Neoplastic cell nests invade liver parenchyma and dissect hepatocyte strands (\*) leading to loss of normal liver microarchitecture. Hematoxylin and eosin.

Samples from the neoplastic pancreatic tissue and the peripancreatic lymph node were submitted to immunohistochemical examination, with anti-Pancytokeratin, Cytokeratin 7, Vimentin, Synaptophysin, Chromogranin, Neuron-Specific Enolase (NSE), Gastrin, Insulin, Glucagon and Somatostatin antibodies. Intense immunostaining was detected in most neoplastic cells for Chromogranin, Synaptophysin, NSE and Gastrin, in addition to rare cells positive for Vimentin.

Therefore, the diagnosis was compatible with malignant pancreatic gastrinoma with metastasis in the peripancreatic lymph node and liver.

## **DISCUSSION**

Functional endocrine pancreatic neoplasms are a clinical and pathological diagnostic challenge. There are a variety of hormones that can be produced by neoplastic cells, as well as the possibility of more than one hormone being produced concurrently, which generates an equal variety of clinical syndromes (Crona et al., 2016). From a pathological point of view, microscopically, they can present different architectural arrangements, including solid nests, trabeculae, papillae and even ductules, mostly composed of cells in an oncocytic pattern. Immunohistochemical analysis is required to define the peptide(s) produced by neoplastic cells (Asa, 2011).

The dog in this case report initially presented clinical signs that raised the clinical suspicion of insulinoma, due to a history of acute tremors, focused seizures, with significant hypoglycemia, in addition to clinical improvement after administration of intravenous glucose and corticotherapy. The result of the insulin dosage indicated a high probability of being an insulinoma, as the suspicion of this neoplasm occurs in situations where insulinemia is greater than 20  $\mu\text{U/ml}$  in association with a blood glucose of 60 mg/dL, and in patient was verified 61  $\mu\text{U/ml}$  of insulinemia with hypoglycemia of 28 mg/dL (Pascon and Mistieri, 2016; Idowu and Heading, 2018). In this scenario, clinical treatment for insulinoma was instituted. However, after death and immunohistochemical evaluation of a pancreatic neoplastic tissue sample, the pattern of positivity favored the diagnosis of gastrinoma, an endocrine neoplasm different from the initial clinical suspicion.

Some hypotheses could justify a post-mortem diagnosis different from the clinical suspicion. The first is the possibility of the coexistence of two neoplasms, in the condition known in Human Medicine as Multiple Endocrine Neoplastic Syndrome type

1 (MEN 1). However, insulinoma associated with pancreatic gastrinoma do not fit the classification of multiple endocrine neoplasms (MEN 1), as this nomenclature used in human medicine encompasses only parathyroid adenomas, enteropancreatic endocrine tumors and pituitary tumors (Lee et al., 2010). ). Despite this, Lodish et al. (2008), reported the picture of a human patient with a disorder similar to the present report, who presented both hyperinsulinemic and hypergastrinemic syndrome. And in veterinary medicine there is only one study developed by Beatrice et al. (2018), in which it was concluded that possibly the combinations of endocrine tumors between humans and companion animals are different, but no case was cited that resembled this report (pancreatic insulinoma and gastrinoma).

Another case described in human medicine (LEE et al., 2010) found three types of tumors, in addition to gastrinoma and insulinoma, also hyperparathyroidism, in the same patient; however, unlike the previous report, these are from different places/organs. Immunohistochemical analysis indicated the presence of insulin in pancreatic tumor cells and gastrin liver cells.

In humans, the most common symptoms of gastrinoma include persistent abdominal pain, nausea, diarrhea, weight loss, and gastrointestinal bleeding (Lipiński et al., 2017). In dogs, the most common clinical signs include regurgitation, vomiting, melena, anorexia, diarrhea and weight loss (Hughes, 2006; Pasconi and Mistieri, 2016). The patient in the present report had clinical and laboratory signs that favored the suspicion of insulinoma, due to neuroglycopenic effects, but there were also other signs suggestive of gastrinoma, such as frequent episodes of emesis, progressive weight loss and darkened pasty diarrhea.

With regards to laboratorial changes, in dogs with gastrinoma, regenerative anemia, leukocytosis with neutrophilia and hypoproteinemia related to the intestinal inflammatory condition can be noted, as well as changes in liver enzymes, such as alanine aminotransferase and alkaline phosphatase (Pascon and Mistieri, 2016) . At the same time, the case reported here presented as alterations in hematological exams, progressive anemia, leukocytosis with neutrophilia and increased liver enzymes (ALT and FA).

As for location, gastrinomas in humans appear in extrapancreatic sites, especially duodenum, in more than two thirds of cases, so that more than 90% of these tumors are located in the so-called triangle of gastrinomas, which is the area delimited by the duct biliary, duodenum, and pancreas (Vergine et al., 2005; Beltrán, 2016;

Lipiński et al., 2017). In dogs, this endocrine neoplasm is most commonly described as originating in the pancreas, as in the present report (Pascon and Mistieri, 2016). However, some reports indicate other sites of appearance of this neoplasm, such as in the duodenal wall causing obstruction of the bile duct (Vergine et al., 2005) and liver (Kim et al., 2015).

In humans, pancreatic gastrinomas have liver metastases more frequently (Béltran, 2016; Lipiński et al., 2017), as observed in this report, both in the ultrasound examination (hypoechoic liver nodules) ante-mortem, and in necropsy and histopathology (multiple nodules in liver parenchyma).

The treatment of the reported patient was based on the suspicion of insulinoma, with administration mainly of prednisone, as glucocorticoids reduce the affinity of glucose for insulin receptors present in tissues (Pascon and Mistieri, 2016). And with the progression of clinical signs, and due to hematological changes suggestive of possible infection, antibiotic therapy and gastric protection were associated with treatment.

In cases of gastrinoma, there is little information in the literature on indications for surgical interventions, as there are difficulties in the complete excision of the neoplasm and a high rate of metastasis, however - frequent failure in the evolution of surgically treated cases compared to cases with clinical treatment, thus leading to questioning such surgical interventions (Metz, 2012; Béltran, 2016; Pascon and Mistieri, 2016). In the present report, surgical intervention was not suggested due to the presence of extensive areas of possible liver metastases observed by means of ultrasonography.

The prognosis for gastrinoma in human medicine is good, even in malignant cases, when diagnosed early (Beltrán, 2016). However, there are some factors that make the prognosis poor, such as liver metastases, large primary tumor (1 to 3 cm) and pancreatic location (Lipiński et al., 2017), conditions found in the case of this report. In dogs, the prognosis is predominantly poor, as in most cases the diagnosis occurs when there has already been metastasis, mainly in lymph nodes and liver (Hughes, 2006).

The similarity between the human cases mentioned and the patient mentioned in this report is remarkable, with the exception that in this report it was not possible to diagnose endocrine neoplasia of pancreatic beta cells. And facing this, new assumptions must be raised. For this absence of insulin-producing tumor cells, the justification can

be attributed that the sample submitted to immunohistochemical analysis may not have been representative of the neoplastic process of insulinoma and only of gastrinoma.

Another hypothesis is that the serum insulin levels during hypoglycemia are a consequence of the presence, together with the gastrinoma, of non-pancreatic alterations. An observation made by Idowu and Heading (2018) highlighted that the most common causes of hypoglycemia in 55 dogs evaluated were: insulinoma, in 69% of cases; extrapancreatic tumor, in 14%; sepsis, in 7%; hypoadrenocorticism in 6% and liver failure in 4% of patients. It is notorious that any non-pancreatic neoplasm has the potential to cause hypoglycemia. This mechanism occurs due to several factors, including the paraneoplastic effect causing the release of insulin or insulin analogues; and the effects of the tumor itself with the excessive use of glucose; in liver tumors it is possible due to damage to liver cells responsible for hepatic glucose homeostasis. The most common tumors associated with this type of change are hepatocellular carcinoma, hepatoma, leiomyoma and leiomyosarcoma (Idowu and Heading, 2018).

Ultimately, it is reasonable to consider that the hyperinsulinism in this report could be due to islet hyperplasia (Felício et al., 2012), although this finding lacks immunohistochemical confirmation.

The fact that no treatment was carried out for the gastrinoma, diagnosed post-mortem, may have contributed to the progression of clinical signs and worsening of the patient. However, it is known that the main determining factor for the survival of patients with gastrinoma is related to the early diagnosis, and the absence of metastases, so this may have also contributed to the rapid worsening of the patient, as there were already metastases at the time of the consultation.

## **CONCLUSION**

Through the analysis, there is evidence that the malignant pancreatic gastrinoma in dogs may be associated with lesions or hyperplasia of the pancreatic islet cells causing atypical clinical and laboratory characteristics. Therefore, the exposed report highlights the need for further biochemical and immunohistochemical investigations of pancreatic islet cell tumors in veterinary. In addition, there is a need for a more accurate classification of multiple endocrine neoplasms, as this would facilitate a faster diagnosis and most appropriate treatment.

## REFERENCES

- ASA, SL. Pancreatic endocrin tumors. *Modern Pathology*, v. 24, S66-S77, 2011.
- BELTRÁN, MA. Síndrome de Zollinger-Ellison: revisión del conocimiento actual. *Revista Colombiana de Cirugía*, v.31, p.197-211, 2016.
- BEATRICE, L. *et al.* Concurrent endocrine neoplasias in dogs and cats: a retrospective study (2004 – 2014). *Vet record*, 2018. Disponível em: <<https://veterinaryrecord.bmj.com/content/182/11/323>>. Acesso em: 29 janeiro 2021.
- CRONA, J. *et al.* Multiple and Secondary Hormone Secretion in Patients With Metastatic Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 101, n. 2, p. 445-452, 2016.
- FELÍCIO, JS *et al.* Hiperinsulinismo endógeno: revisão e seguimento de 24 casos. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 56, n. 2, p. 83-95, 2012.
- HUGHES, SM. Canine gastrinoma: A case study and literature review of therapeutic options. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 54, n. 5, p.242-247, 2006.
- IDOWU, O.; HEADING, K. Hypoglicemia in dogs: Causes, management, and diagnosis. *The Canadian Veterinaty Journal*, v. 59, p. 642 -649, 2018.
- KIM, S.; HOSOYA, K.; TAKAGI, S.; OKUMURA, M. Treatment of Gastrin-Secreting Tumor With Sustained-Release Octreotide Acetate in a Dog. *Journal American Animal Hospital Association*, v. 51, p. 407-412. 2015.
- LEE, SR.; CHOI, MC.; AHN, KJ. A Case of Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 with Primary Liver Gastrinoma. *Journal of Korean Medical Science*, v. 25, p. 953-956, 2010.
- LIPÍŃSKI, M. *et al.* Gastroduodenal neuroendocrine neoplasms, including gastrinoma – management guidelines (recommended by the Polish Network of Neuroendocrine Tumours). *Endokrynologia Polska*. v. 68, n.2, p. 138-153, 2017.
- LODISH, MB. *et al.* Insulinoma and gastrinoma syndromes from a single intrapancreatic neuroendocrine tumor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 93, n. 4, p. 1123-1128, 2008.
- METZ, D. C. Diagnosis of the Zollinger-Ellison Syndrome. *Clinical gastroenterology and hepatology*, v.10, p.126-130, 2012.
- PASCON, J. P. E. ; MISTIERY, M. L. A. Neoplasias do Pâncreas Endócrino. In: DAKECL, C. R.; DE NARDI, A.B. *Oncologia em cães e gatos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda, v. 2, cap. 34, p. 642-652, 2016
- VERGINE, M. *et al.* Common bile duct obstruction due to a duodenal gastrinoma in a dog. *The Veterinary Journal*. v. 170, p. 141-143, 2005.
- ZOLLINGER, R. M.; ELLISON, E. H. Primary peptic ulcerations of the jejunum associated with islet cell tumors of the pancreas. *Annals Surgery*, v. 142, p. 709-728, 1955.