

UNIVERSIDADE SANTO AMARO
Mestrado em Medicina e Bem-Estar Animal

Catherine Biondo Feitosa

CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE FEZES DE ANIMAIS DE COMPANHIA

São Paulo
2021

Catherine Biondo Feitosa

**CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE FEZES DE ANIMAIS DE COMPANHIA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação *Strictu Senso* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina e Bem-Estar Animal.
Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Cortez

São Paulo

2021

F336c Feitosa, Catherine Biondo

Caracterização de amostras de *Escherichia coli* isolada de fezes de animais de companhia / Catherine Biondo Feitosa. – São Paulo, 2021.

48 f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Medicina Veterinária) - Universidade Santo Amaro, 2021.

Orientador(a): Profa. Dra. Adriana Cortez.

1. *Escherichia coli*. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Animais de companhia. I. Cortez, Adriana, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

Elaborada por Maria Lucélia S Miranda – CRB 8 / 7177

Catherine Biondo Feitosa

**CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE FEZES DE ANIMAIS DE COMPANHIA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação *Strictu Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina e Bem-Estar Animal.

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Cortez

São Paulo, 27 de janeiro de 2022

Banca Examinadora

Prof. Dra. Adriana Cortez

Profa.Dr. Bruno Miotto

Profa.Dra Marina Tiemi Shio

Conceito Final: _____

Dedico este trabalho a todos aqueles que acham
que é impossível chegar aonde desejam,
"O impossível existe até que alguém
duvide dele e prove o contrário."

Agradecimentos

Agradeço a Deus por Seu amor ao me ouvir, abençoar, guardar, prover tudo que preciso, me sustentando até aqui, por provar que os Teus planos para nossas vidas sempre são maiores que os nossos sonhos!

Gratidão a minha família.

Ao meu amigo, companheiro, amor da minha vida, José Paulo, por sempre estar torcendo ao meu lado, pela paciência e apoio, pelos momentos que tive que abrir mão de muitas coisas, e ainda assim, esteve do meu lado, dizendo: Vai dar tudo certo! Obrigada amor, por existir em minha vida! Te amo!

Ao longo das nossas vidas, Deus coloca pessoas em formas de bênçãos em nossos caminhos, uma delas é a minha ex-orientadora Amane Paldês Gonçalves, mais que uma professora, uma mulher de exemplo e valor, um profissionalismo do qual passei a admirar. A professora Adriana Cortez, por me aceitar em uma fase difícil, tornar a minha orientadora, me auxiliando a concluir um novo projeto, minha eterna gratidão por todo empenho, abrindo mão dos seus dias de descanso, para fazer o impossível, tornar-se possível!

Aos meus professores do Mestrado, por nos fazer enxergar novos horizontes!

Ao programa de Mestrado e a bolsa concedida pela UNISA, pela oportunidade de proporcionar meios financeiros para que este trabalho fosse realizado, que além do incentivo durante o percurso, continua me ensinando a amar o ensino e a pesquisa através de todos os projetos que passei, essa "casa" será sempre levada em meu coração e por onde eu estiver.

Agradeço também aquelas pessoas que cederam as amostras do novo projeto, auxiliando em todo o processo de resultados, aos colaboradores dos laboratórios da USP-SP, representando um marco especial neste processo, a Médica Veterinária Doutora Natália Gaeta.

Enfim...

Hoje não quero pedir meu Deus, apenas AGRADECER por todas as bênçãos e pedir uma bênção especial na vida de cada um de todos vocês que fizeram parte desta trajetória!

“Nada temos a temer quanto ao futuro, a menos que nos esqueçamos como Deus nos guiou no passado...”

Ellen G. White

RESUMO

A domesticação de cães e gatos tornou a convivência do homem cada vez mais próxima e afetuosa com estes animais. Nos últimos anos, a forte interação da sociedade com os animais de companhia, faz com que a atenção á sanidade dos mesmos seja despercebida. Dentre as inúmeras doenças que merecem destaque, a colibacilose é uma doença infectocontagiosa que acomete inúmeras espécies de animais e o homem. Devido a sua importância, *Escherichia coli* é considerada uma das espécies mais estudada em medicina humana e veterinária. Embora seja um microrganismo comensal da microbiota entérica dos mamíferos domésticos, outros vertebrados e o homem, algumas amostras de *E. coli* apresentam diferentes mecanismos e fatores de virulência que alteram os processos celulares, tornando-se potencialmente patogênicas, essas linhagens são divididas em duas categorias: entéricas e extraentéricas. O uso arbitrário de antimicrobianos vem impactado diretamente no surgimento de bactérias resistentes. Neste contexto, a *E. coli* tem favorecido o aumento da resistência e multirresistência aos antimicrobianos, que podem ser responsáveis por falhas de tratamento em humanos e na medicina veterinária. Devido a sua versatilidade e potencial patogênico, a *E. coli* também afeta animais de companhia, levando a desordens entéricas e geniturinárias. O estreito vínculo entre animais de companhia e seres humanos propiciam a possibilidade de compartilhamento de microrganismos entre as espécies, e, desta forma, vem se discutindo o papel do animal de estimação como sentinelas de resistência no ecossistema humano, podendo adquirir ou compartilhar para o homem *E. coli* patogênicas ou multirresistentes a antimicrobianos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados de *E. coli* provenientes de amostras de fezes de cães e gatos, enviadas para coproparasitológico a um laboratório particular na cidade de Botucatu-SP. Após o isolamento e identificação, foi realizado a caracterização dos fatores de virulência das amostras e submetidas ao teste de susceptibilidade bacteriana e teste de aproximação dos discos (Double-Disk Screening”) para a triagem de *E. coli* com beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). Foram analisados 102 isolados de *E. coli* provenientes de cães e gatos, desses 30,4% (31/102) pertenciam ao filogruppo A, 25,5% (26/102) pertenciam ao filogruppo B2, 18,6% (19/102) ao F, 15,7% (16/102) ao filogruppo D, 3,9% ao B1 (4/102) e C (4/102) e 2% (2/102) ao E. Diante disso, de acordo com os resultados apresentados, conclui-se que, foi possível detectar isolados de *E.*

coli dos patótipos STEC (*E. coli* shigatoxigênica) e EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica) com diferentes perfis fenotípicos de resistência e de filogrupos distintos. O encontro de isolados multirresistentes, com perfil de betalactamase estendida e isolados multirresistentes, inclusive ao ertapenem em amostras enviadas para diagnóstico coproparasitológico servem de alerta para uma melhor condução no uso de antibióticos e um lembrete aos técnicos e veterinários que fazem o coproparasitológico que mantenham as medidas de biossegurança e de higiene pessoal.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, resistência antimicrobiana, animais de companhia

ABSTRACT

The domestication of dogs and cats made the coexistence of man closer and affectionate with these animals. In recent years, the strong interaction of society with companion animals, makes the attention to their health go unnoticed. Among the numerous diseases that deserve to be highlighted, colibacillosis is an infectious disease that affects many species of animals and man. Due to its importance, *Escherichia coli* is considered one of the most studied species in human and veterinary medicine. Although it is a commensal microorganism of the enteric microbiota of domestic mammals, other vertebrates and man, some *E. coli* samples have different mechanisms and virulence factors that alter cellular processes, becoming potentially pathogenic, these strains are divided into two categories: enteric and extraenteric. The arbitrary use of antimicrobials has a direct impact on the emergence of resistant bacteria. In this context, *E. coli* has favored the increase in resistance and multidrug resistance to antimicrobials, which may be responsible for treatment failures in humans and veterinary medicine. Due to its versatility and pathogenic potential, *E. coli* also affects companion animals, leading to enteric and genitourinary disorders. The close bond between companion animals and human beings provides the possibility of sharing microorganisms between species, and, in this way, the role of the pet as sentinels of resistance in the human ecosystem, being able to acquire or share for man, has been discussed. *E. coli* pathogenic or multiresistant to antimicrobials. The objective of this work was to characterize *E. coli* isolates from samples of feces of dogs and cats, sent for coproparasitology to a private laboratory in the city of Botucatu-SP. After isolation and identification, the virulence factors of the samples were characterized and submitted to the bacterial susceptibility test and the disk approach test (Double-Disk Screening) to screen for *E. coli* with extended-spectrum beta-lactamase. (ESBL). A total of 102 *E. coli* isolates from dogs and cats were analyzed, of which 30.4% (31/102) belonged to phylogroup A, 25.5% (26/102) belonged to phylogroup B2, 18.6% (19/ 102) to F, 15.7% (16/102) to phylogroup D, 3.9% to B1 (4/102) and C (4/102) and 2% (2/102) to E. Therefore, according to the results presented, it was concluded that it was possible to detect *E. coli* isolates of the STEC (Shiga toxin-producing *E. coli*) and EHEC (Enterohaemorrhagic *E. coli*) pathotypes with different phenotypic profiles of resistance and different phylogroups. The finding of multidrug-resistant isolates, with an extended beta-lactamase profile, and multidrug-

resistant isolates, including ertapenem in samples sent for coproparasitological diagnosis, serve as an alert for better management in the use of antibiotics and a reminder to technicians and veterinarians who perform coproparasitological measures to maintain the measures biosafety and personal hygiene.

Keywords: *Escherichia coli*, antimicrobial resistance, companion animals

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Frequência relativa em porcentagem do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados obtidos de cães e gatos do Filogrupo A	40
Tabela 2 - Frequência relativa em porcentagem do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados obtidos de cães e gatos do Filogrupo B2.....	43
Tabela 3 - Frequência relativa do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados obtidos de cães e gatos do Filogrupo F.....	45
Tabela 4 - Frequência relativa do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados obtidos de cães e gatos do Filogrupo D	47
Tabela 5 - Frequência relativa do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados obtidos de cães e gatos do Filogrupo D.....	48
Tabela 6 - Frequência relativa do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados obtidos de cães e gatos independente do patotipo e do filogrupo.....	49
Tabela 7 - Frequência absoluta dos perfis fenotípicos de resistência aos antibióticos testados dos isolados de <i>E. coli</i> provenientes de cães e gatos.....	50
Tabela 8 - Isolados de <i>E. coli</i> com perfil multirresistente provenientes de fezes de animais de companhia. São Paulo 2022.....	51
Tabela 9 - Perfil de sensibilidade microbiana dos isolados EBLTs <i>E. coli</i>	52

Lista de Quadros

Quadro 1 - Perfil de virulência e sensibilidade microbiana dos isolados de <i>E. coli</i> de cães e gatos pertencentes ao Filogrupo A. São Paulo, 2021	39
Quadro 2 - Perfil de virulência e sensibilidade microbiana dos isolados de cães e gatos pertencentes ao Filogrupo B2. São Paulo, 2021	42
Quadro 3 - Perfil de virulência e sensibilidade microbiana dos isolados de cães e gatos pertencentes ao Filogrupo F. São Paulo, 2021	44
Quadro 4 - Perfil de virulência e sensibilidade microbiana dos isolados de cães e gatos pertencentes ao Filogrupo D. São Paulo, 2021	46
Quadro 5 - Perfil de virulência e sensibilidade microbiana dos isolados de cães e gatos pertencentes ao Filogrupo C. São Paulo, 2021	48

Lista de Figuras

- Figura 1** - Perfis Quadruplex PCR do novo método de filotipagem de “Clermont”31
- Figura 2** - Foto de um isolado ESBL positivo, mostrando o perfil fantasma.....52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Etiologia	18
2.2	Patotipos e patogênese.....	19
2.2.1	<i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC)	20
2.2.2	<i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC).....	21
2.2.3	<i>E. coli</i> entero-hemorrágica (EHEC) ou shigatoxigênica (STEC)	22
2.2.4	<i>E. coli</i> O157:H7 e sua importância.....	22
2.2.5	<i>E. coli</i> enteroinvasora (EIEC), <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC) e <i>E. coli</i> de aderência difusa (DAEC).....	24
2.3	EPIDEMIOLOGIA	24
2.4	RESISTÊNCIA AMBIENTAL DE <i>E. COLI</i>	25
3	IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	26
4	IMPORTÂNCIA EM ANIMAIS DE COMPANHIA.....	28
5	DIAGNÓSTICO.....	29
6	JUSTIFICATIVA.....	32
7	OBJETIVOS.....	33
8	MATERIAIS E MÉTODO	34
8.1	Caracterização das amostras	34
8.2	Isolamento bacteriano.....	34
8.3	Identificação das colônias.....	34
8.4	Identificação do filogrupa.....	34
8.5	Caracterização dos fatores de virulência.....	35
8.6	Teste de susceptibilidade bacteriana.....	35
8.7	Caracterização fenotípica de isolados de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) por Teste aproximação dos discos.....	35
8.8	Análise estatística.....	36
9	RESULTADOS	37
10	DISCUSSÃO.....	53
11	CONCLUSÃO.....	58
12	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Dentre as inúmeras doenças que acometem os animais, a colibacilose é uma das que merecem destaque por causar diferentes manifestações clínicas em seus hospedeiros, ser considerada uma zoonose e apresentar distribuição mundial. Pode afetar inúmeras espécies, desde os animais de companhia às criações pecuárias (bovina, bubalina, suína, caprina, ovina e galináceos), exemplares silvestres, selvagens, dentre outras (JARLIER et al., 1988; MEGID et al., 2016).

Escherichia coli é uma bactéria comensal do trato digestório de mamíferos domésticos e de outros vertebrados. Entretanto, algumas estirpes de *E. coli* apresentam diferentes mecanismos e fatores de virulência que alteram os processos celulares, tornando-se potencialmente patogênicas. Essas linhagens são divididas em duas categorias: entéricas e extraentéricas (JARLIER et al., 1988; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; BOUZARI; JAFARI; ASLANI, 2012).

As desordens entéricas são descritas como um dos principais sintomas relacionados a infecção por *E. coli* devido a sua importância clínica. *E. coli* são classificadas em *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), também chamada como produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC). *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) é classificada devido a sua ação oportunista em outros sistemas que não seja o digestivo, como a *E. coli* uropatogênica (UPEC) e septicêmica (GOFFAUX et al., 2000; DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2016; TORRES, 2017; DERAKHSHANDEH et al., 2018).

A indústria avícola sofre perdas econômicas devido a infecções extraintestinais e colisepticemia em aves, causada pela *E. coli* patogênica aviária (APEC) (MOL et al., 2019; KIM et al., 2020). *E. coli* é um dos agentes infecciosos que merece atenção tanto por autoridades de saúde, como também a comunidade científica, pois além de causar graves prejuízos a indústria de produção animal, em seres humanos as infecções resultam em colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), principalmente em casos que envolvem o patógeno emergente O157:H7, de destaque em nível mundial devido a severidade dos seus surtos. A ingestão de alimentos de origem animal (leite cru, carne, como também carcaças) e água contaminados são considerados para os seres humanos a principal

forma de transmissão de EHEC (LIM; YOON; HOVDE, 2010; D ANIEL DE PAULA; CASARIN; TONDO, 2014).

A deficiência de condições higiênico-sanitárias favorecem a infecção por *E. coli*, sendo que as manifestações clínicas estão intimamente relacionadas com os mecanismos de fatores de virulência, capacidade de invasão dos tecidos e produção de toxinas (TORRES, 2017).

Nos últimos anos, o uso abusivo e arbitrário de antimicrobianos no tratamento de doenças de seres humanos e animais tem favorecido o surgimento de microrganismos resistentes (PUVAČA; FRUTOS, 2021). Neste contexto, a *E. coli* tem favorecido o aumento da resistência e multirresistência aos antimicrobianos, que podem ser responsáveis por falhas de tratamento em humanos e na medicina veterinária (MURPHY et al., 2010; SALGADO-CAXITO et al., 2021).

Devido a sua versatilidade e potencial patogênico, a *E. coli* também afeta animais de companhia, levando a desordens entéricas e geniturinárias. O aumento crescente da população de cães e gatos e o estreito vínculo entre animais de companhia e seres humanos propiciam a possibilidade de compartilhamento de microrganismos entre as espécies, e, desta forma, vem se discutindo o papel do animal de estimação como sentinelas de resistência no ecossistema humano, podendo adquirir ou compartilhar para o homem *E. coli* patogênicas ou multirresistentes a antimicrobianos (MORATO et al., 2009; DUPONT et al., 2013; WALTHER et al., 2017; DERAKHSHANDEH et al., 2018; FERNANDES et al., 2018; SELLERA et al., 2018; KARKABA et al., 2019; TAKAGI et al., 2020). Além disso, há relatos que humanos podem atuar também como reservatório, havendo a possibilidade de que alguns animais, devido ao contato próximo, principalmente os animais de estimação, possam contrair cepas de *E. coli* patogênicas (MOURA et al., 2009; BÉLANGER et al., 2011; TOOMBS-RUANE et al., 2020).

Devido as importâncias levantadas, o objetivo deste trabalho é caracterizar e isolar *E. coli* de amostras de fezes de cães e gatos. O monitoramento dos seres humanos e animais de companhia, dados sobre a epidemiologia, o conhecimento sobre as características genotípicas, fatores de virulência, distribuição filogenética de amostras de *E. coli* e resistência aos antimicrobianos. Estes são dados que contribuirão para medidas de controle e de transmissão interespecies, para redução do impacto econômico da *E. coli* e melhoria da Saúde Pública como um todo (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; DERAKHSHANDEH et al., 2018; TORRES, 2017).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

E. coli é uma bactéria Gram-negativa, que se apresenta na forma de cocobacilos pertencentes a família *Enterobacteriaceae*. São anaeróbios facultativos, não formam esporos e, em sua maioria, tem capacidade de locomoção, devido a presença de flagelo (JARLIER et al., 1988; MEGID et al., 2016; GREENE et al., 2015).

Embora o gênero *Escherichia* seja composto por diversas espécies, atualmente a espécie *E. coli* é considerada a mais estudada em medicina humana e veterinária por sua importância clínica, e ao ser comparada aos demais microrganismos, quando mantida em condições favoráveis, apresenta facilidade de crescimento e baixo custo em laboratório (VILA et al., 2016). As mudanças fenotípicas e genotípicas, a capacidade adaptativa, sua diversidade antigênica, bem como a transferência horizontal de genes tornam a espécie *E. coli* um importante modelo de estudo e desenvolvimento no campo da biologia molecular e biotecnologia, envolvendo a produção de medicações, vacinas, armazenamento de dados, entre outros (ROSANO; CECCARELLI, 2014; GOMES et al., 2016; FAUSTINO et al., 2016).

É conhecida por ser um microrganismo comensal da microbiota entérica presente na maior parte dos mamíferos domésticos, outros vertebrados e o homem. Alguns isolados de *E. coli* são patogênicos ao hospedeiro e, desta forma, descritos como um dos agentes etiológicos mais encontrados em casos de diarreias de origem bacteriana em animais e seres humanos (BÉLANGER et al., 2011; FACCO, 2015; MEGID et al., 2016; VILA et al., 2016; FRANCO, 2017; DERAKHSHANDEH et al., 2018; VEGA-MANRIQUEZ et al., 2020; PUVAČA et al., 2021).

A colibacilose entérica é uma das mais importantes enfermidades causadas por estirpe patogênica de *E. coli*. A capacidade de produzir ou não a afecção está intimamente relacionada pela presença e expressão de fatores de virulência e diferentes propriedades do agente. A virulência do microrganismo é dada através de múltiplos fatores, tais como componentes da estrutura bacteriana (adesinas fimbriais e não fimbriais, que promovem a aderência da bactéria ao enterócito, resultando em diarreia por diferentes mecanismos, dependendo do patotipo), a produção de endotoxinas (componentes intrínsecos da estrutura bacteriana), exotoxinas (enterotoxinas, verotoxinas, fator necrosante citotóxico e hemolisinas), bem como a

capacidade de resistência aos antimicrobianos (VON SYDOW et al., 2004; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; ZACHARY et al., 2013).

Assim como as demais enterobactérias, *E. coli* apresenta em sua parede celular lipopolissacarídeo (LPS), compostos de lipídeo A (interno) e polissacarídeo O (externo). O antígeno O (polissacarídeo O) é considerado como um fator altamente antigênico, sendo utilizado na caracterização dos diferentes sorogrupos do microrganismo, enquanto a fração lipídica, quando liberada na corrente sanguínea, resulta na ativação de mediadores pró-inflamatórios que ocasionam o quadro de choque endotóxico (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

2.2 PATOTIPOS E PATOGÊNESE

Nos animais e no homem, a *E. coli* pode acometer qualquer sistema ou órgão, o hospedeiro adquire a infecção pela via oral, respiratória, genital, urinária, umbilical, transcutânea e mamária, além do conduto auditivo. A via oral é, preferencialmente, a porta de entrada da bactéria em animais domésticos e seres humanos. Os animais domésticos adquirem a infecção pela ingestão de água ou alimentos contaminados (GREENE et al., 2015; MEGID et al., 2016).

As manifestações clínicas estão intimamente relacionadas com os mecanismos de ação das *E. coli* patogênicas, tais como expressão de fatores de virulência, capacidade de invasão dos tecidos e produção de toxinas (BOUZARI; JAFARI; ASLANI, 2012). Os microrganismos comensais raramente provocam enfermidades, a não ser em hospedeiros imunocomprometidos, debilitados ou em casos em que a barreira gastrointestinal esteja afetada; ou seja, a *E. coli* “não patogênica” pode causar infecção. O *status* imune do hospedeiro, idade e espécie influenciam no acometimento e progressão da doença (KAPER et al., 2004; ZACHARY et al., 2013; GOMES et al., 2016).

Em contrapartida, certos isolados de *E. coli* possuem fatores de virulência, tornando-se patogênicas para animais e humanos, sendo capazes de causar um amplo espectro de doenças. *E. coli* patogênica provoca infecções entéricas graves (diarreia, colite hemorrágica, doença do edema e síndrome hemolítico-urêmica), ou extraentéricas (infecção do trato urinário (ITU), meningite, pneumonia, peritonite, mastite, piometra, onfalopatias, otite e dermatite). Ainda assim, distúrbios entéricos

são a principal decorrência comumente notada em infecções por cepas de *E. coli* patogênica (MORATO et al., 2009; VILA et al., 2016).

A importância clínica e de maior impacto em saúde pública e animal da *E. coli* ocorre pela presença de linhagens patogênicas, que podem ser divididas em duas categorias: entéricas e extraentéricas, podendo ainda serem classificadas como, *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), também chamada como produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* aderente difusa (DAEC), *E. coli* uropatogênicas (UPEC) e septicêmicas (DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2016; CASAGRANDE, 2016; CDC, 2021).

As amostras patogênicas de *E. coli* isoladas são classificadas em grupos ou patotipos e caracterizadas de acordo com os mecanismos de invasão celular, produção de toxinas e manifestações clínicas em seus respectivos hospedeiros. As bactérias do gênero *Escherichia coli* também são discriminadas em dois grandes grupos: *E. coli* patogênica intestinal (Intestinal Pathogenic *E. coli*, InPEC) conhecida também como diarreiogênica, ocasionando quadros de diarreia e alterações intestinais no hospedeiro acometido, e *E. coli* patogênica extraintestinal (Extra-Intestinal Pathogenic *E. coli*, ExPEC), de grande importância, relatada tanto em humanos e animais de qualquer faixa etária, devido ao acometimento de outros órgãos e sistemas, como, por exemplo, infecções do trato urinário (ITU e pielonefrite), genital (piometra em cadelas), mastite e distúrbios uterinos em vacas, meningite em neonatos, afecções em tecidos moles, infecções intra-abdominais e pneumonia (principalmente em humanos hospitalizados), dentre outras (YURI et al., 1999; DEBROY et al., 2001; BÉLANGER et al., 2011; BOUZARI; JAFARI; ASLANI, 2012; TORRES, 2017; DERAKHSHANDEH et al., 2018).

2.2.1 *E. COLI* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)

As linhagens de EPEC foram primeiramente reconhecidas como a mais versátil entre as categorias de *E. coli* diarreiogênica, sendo classificadas em típica (EPEC-t) e atípica (EPEC-a). O principal reservatório da EPEC-t é o ser humano, embora a sua categoria original de EPEC apresente comportamento epidemiológico restrito ao homem, ocorrências em alguns animais silvestres já foram registradas. Em ambientes

aquáticos ou terrestres a EPEC-a pode estar presente, sendo encontrada em alimentos, bem como a uma ampla variedade de hospedeiros animais que podem ser reservatórios e fonte de contaminação para o ambiente e transmissão ao homem (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; BOUZARI; JAFARI; ASLANI, 2012; DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2016).

EPEC representa a principal causa de distúrbios entéricos (diarreia crônica) acompanhados de vômitos e febre em animais jovens e crianças de até um ano de idade. O mecanismo da patogênese de EPEC é caracterizado pela íntima adesão da bactéria e colonização no epitélio intestinal; não produzem nenhum tipo de toxina, mas formam lesões em formato de pedestais (*attaching and effacing A/E*), que por sua vez, promovem modificações na constituição e destruição das microvilosidades, de modo que alteram a capacidade de absorção dos enterócitos, levando conseqüentemente a má absorção dos nutrientes, perda de peso, retardo de crescimento e alta letalidade em pacientes jovens. A lesão A/E é originada por genes que estão inseridos numa ilha de patogenicidade chamada LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*); a aderência localizada (AL) mediada pela fímbria BFP (*bundle-forming pilus*) e codificada pelo gene plasmidial (EAF); sinais de transdução e aderência íntima promovida pela intimina (*gene eae*) correspondem respectivamente os estágios de interação entre EPEC e as células do epitélio intestinal (GOFFAUX et al., 2000; MOURA et al., 2009; DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2016; CASAGRANDE, 2016; ARAIS et al., 2018).

2.2.2 E. COLI ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC)

As linhagens de ETEC acometem animais e seres humanos. A superfície da mucosa do intestino delgado é colonizada, principalmente o íleo, onde ocorre a produção de enterotoxinas. A colonização é mediada pela presença de receptores específicos para adesinas e fímbrias que atuam através da aderência dos microrganismos no epitélio intestinal. Quadros de diarreia, cólicas abdominais, vômitos e desidratação são descritos por diferentes sorogrupos e sorotipos. A ETEC é considerada para a indústria um patógeno de importância, devido as perdas econômicas na produção de aves, suínos e bovinos. As toxinas podem ser produzidas de forma isolada ou conjunta, sendo divididas em dois principais tipos: toxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST). As duas modificam as funções dos enterócitos,

embora não induzam alterações morfológicas no epitélio intestinal, aumentam a secreção de fluídos para o lúmen, provocando diarreia e acidose metabólica (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; BOUZARI; JAFARI; ASLANI, 2012; GOMES et al., 2016; VEGA-MANRIQUEZ et al., 2020).

2.2.3 *E. COLI* ENTERO-HEMORRÁGICA (EHEC) OU SHIGATOXIGÊNICA (STEC)

As linhagens de EHEC/STEC são conhecidas tipicamente por pertencerem a um grupo bem conhecido de patógenos de origem alimentar distribuídos em todo o mundo. A diarreia sanguinolenta aguda é a principal manifestação clínica, bem como colite hemorrágica (HC) e, em casos mais severos, provocam a síndrome hemolítico-urêmica (SHU), e até a morte. A patogenicidade está estreitamente relacionada à condensação da actina, destruição das microvilosidades, aderência íntima aos enterócitos (efeito A/E observado também em EPEC) e o transporte e produção da toxina de Shiga pela *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), também descrita como *E. coli* verotoxigênica (VTEC), devido seu efeito citotóxico em células Vero. A EHEC produz duas toxinas imunologicamente distintas, nomeadas verotoxinas (VT1 e VT2). Devido à similaridade da atividade biológica e estrutura das VT e da toxina produzida por *Shigella dysenteriae* (ST), VT1 e VT2 são conhecidas, também, como *Shiga-like* toxina 1 (SLT1) e *Shiga-like* toxina 2 (SLT2), posteriormente foram renomeadas como Stx1 (VT1 ou SLT1), Stx2 (VT2 ou SLT2) e, atualmente por STEC (MOURA et al., 2009; GOMES et al., 2016).

2.2.4 *E. coli* O157:H7 e sua importância

O sorotipo O157:H7 é um patógeno emergente que pertence ao grupo das EHEC, o sorotipo continua sendo reconhecido pelo mundo por causar doenças graves em seres humanos, devido as manifestações clínicas entéricas e renais. A *E. coli* O157:H7 é considerado o mais importante patógeno alimentar dessa classe. Algumas espécies de animais são consideradas portadores assintomáticos de EHEC, sendo,

portanto, as principais fontes de infecção deste patotipo (DANIEL DE PAULA; CASARIN; TONDO, 2014).

Os bovinos desempenham um papel importante neste ciclo de transmissão, pois são considerados reservatórios da *E. coli* O157:H7 e podem excretar o agente pelas fezes. O contato do ser humano com carcaças contaminadas por dejetos durante o abate, bem como, o consumo de variados tipos de alimentos, carne bovinas moídas, suínas e de frango, além de embutidos mal cozidos, alimentos não cárneos, legumes e verduras contaminadas, água e o ambiente são meios de transmissão que ocasionam surtos e casos esporádicos de *E. coli* O157:H7 (LIM; YOON; HOVDE, 2010; CASAGRANDE, 2016; FAÚLA, 2016).

E. coli O157:H7 tem a capacidade de persistir e sobreviver em diversos tipos de ambientes e reservatórios de animais. Há relatos de *E. coli* O157:H7 em fezes de animais domésticos sem sinais entéricos (MORATO et al., 2009). Surtos de diarreia sanguinolenta aguda são descritos em grandes proporções, sendo que os hospedeiros acometidos podem apresentar enfermidades de diferentes formas, de grau moderado a severo, entre elas, colite hemorrágica (HC), síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e trombocitopenia trombótica púrpura (TTP) (DANIEL DE PAULA; CASARIN; TONDO, 2014).

Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados para a identificação dos fatores de virulência e os mecanismos da patogênese de *E. coli* O157:H7. Foram identificados três principais fatores de virulência: a toxina Shiga, a presença dos genes responsáveis pela lesão A/E presentes na ilha de patogenicidade conhecida como LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*) e o plasmídeo O157 (pO157). Ao colonizar o epitélio intestinal, o microrganismo se liga intimamente ao intestino e induz a destruição das microvilosidades (lesão A/E), a presença do LEE está fortemente associada à doença. A *E. coli* O157:H7 contém o plasmídeo pO157, uma estrutura dinâmica que inclui diferentes elementos genéticos móveis; a patogenicidade e mecanismos de escape para a resposta imune do hospedeiro ocorre devido a presença de plasmídeo de virulência. (LIM; YOON; HOVDE, 2010; LARA ROSA; FERREIRA BARROS; DE OLIVEIRA SANTOS, 2016).

2.2.5 *E. COLI* ENTEROINVASORA (EIEC), *E. COLI* ENTEROAGREGATIVA (EAEC) e *E. COLI* DE ADERÊNCIA DIFUSA (DAEC)

Os patótipos EIEC, EAEC e DAEC estão correlacionados às infecções intestinais em crianças e adultos e apresentam patogenicidades diferentes, sendo a EIEC invade as células epiteliais e infecta as células adjacentes no espaço intercelular, enquanto na EAEC é caracterizada pelo padrão agregativo, observado nas células entéricas; fator específico de colonização com formação de biofilme, causando a destruição, erosão epitelial e deformidade das vilosidades. Na DAEC a aderência é mediada por adesinas, induzindo modificações nas células epiteliais do intestino que emitem uma estrutura que se projeta da membrana celular para envolver a bactéria. A patogenicidade da EIEC, EAEC e DAEC não estão esclarecidas em afecções entéricas de animais domésticos (MORATO et al., 2009; MEGID et al., 2016).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

Com distribuição mundial, as infecções por *E. coli* podem afetar inúmeras espécies suscetíveis, acometendo desde os animais domésticos, às criações pecuárias, exemplares silvestres, selvagens e o homem. A colibacilose é uma das principais causas de afecções entéricas que provoca morbidade, e em casos mais severos, a mortalidade de animais de produção (bovinos, equinos, suínos, bubalinos, caprinos e ovinos) e criações intensivas de aves, resultando em perdas econômicas irreparáveis (DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2016).

Por pertencer a microbiota entérica, considera-se que todo animal de sangue quente seja capaz de carregar o microrganismo no intestino e, desta forma, os próprios animais são considerados fontes de infecção, pois eliminam o agente no ambiente através das fezes. A manifestação da doença pode ocorrer em casos isolados ou em surtos. Os sorotipos patogênicos de *E. coli* podem ser veiculados pela água não tratada, alimentos e utensílios contaminados, tornando-se as principais vias de transmissão que acometem hospedeiros suscetíveis (TORRES, 2017; DERA KHSHANDEH et al., 2018).

A deficiência de condições higiênico-sanitárias, como o acúmulo de dejetos e matéria orgânica no ambiente, mudanças bruscas de temperatura, umidade e ventilação, modificações em regime alimentar ou desmame, bem como, a criação de um grande número de animais confinados com diferentes idades e categorias, são alguns dos principais fatores que predispõem a infecção por *E. coli* (GREENE et al., 2015; MEGID et al., 2016).

A morbimortalidade dos animais acometidos nas infecções entéricas é variável, pois depende da espécie, idade, saúde do animal, bem como a complexidade dos fatores de virulência da linhagem (DEBROY et al., 2001; YURI et al., 1999; BÉLANGER et al., 2011; CARVALHO et al., 2016; TORRES, 2017).

2.4 RESISTÊNCIA AMBIENTAL DE *E. coli*

Os microrganismos são utilizados como indicadores na avaliação da qualidade microbiológica da água ou alimentos, por fazer parte da microbiota intestinal, tendo como habitat exclusivo, o trato gastrointestinal do homem e dos animais. A *E. coli* é utilizada como indicador de contaminação de origem fecal presente na água e de contaminação fecal da qualidade higiênico-sanitária do alimento. Técnicas laboratoriais rápidas e precisas para detecção, além de apresentar alta resistência ao ambiente extra enteral, classificam a *E. coli* como um bom microrganismo indicador (SOUTO et al., 2015).

Em ambientes favoráveis, onde não há incidência direta de luz solar, a *E. coli* pode permanecer viável por semanas, em água contaminada ou fezes, no entanto, elas não resistem à desinfetantes comuns em concentrações que variam de 3% à 5%, como, por exemplo, hipoclorito de sódio, iodo, amônio quartenário e lisoformes. As condições de tempo e temperatura das técnicas comumente empregadas na pasteurização do leite (técnica lenta, rápida e UHT) inativam a *E. coli*. Até mesmo à fervura do leite pode inativa-la não interferindo, entretanto, nas eventuais toxinas termoestáveis (MEGID, et al., 2016).

3 IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A infecção por *E. coli* ocasiona graves prejuízos a indústria de produção animal. Na avicultura, surtos de *E. coli* patogênicas representam perdas de até 20% do plantel, além de diminuição da taxa de crescimento e condenação de carcaças. Em bovinos, distúrbios entéricos e extraentéricos são constantemente relatados. Mastite em vacas por *E. coli* afeta diretamente a qualidade do leite, tornando onerosa a produção de leite e de seus derivados (BÉLANGER et al., 2011; LANGONI, 2017).

O impacto na suinocultura, frequentemente relatado nas primeiras semanas de vida dos animais, é a diarreia neonatal, a doença do edema e quadros entéricos na fase de pós desmame. Em suínos adultos, as ITUs são uma importante causa de mortalidade. A manifestação septicêmica, em pequenos ruminantes, é mais comum que as enfermidades gastrointestinais, sendo relatada casos de pneumonia, artrite ou encefalite, de alta letalidade e secundárias a sepse (COSTA et al., 2009).

A colibacilose não impacta somente os animais de produção. Nos últimos anos, em várias partes do mundo, surtos de enfermidades humanas foram atribuídas as doenças transmitidas por alimentos (DTA). Nesse contexto, a presença de EHEC O157:H7 em água ou alimentos indica contaminação fecal. Considerada um patógeno emergente de origem alimentar, com importância zoonótica estabelecida, sua infecção resulta em quadros agudos de diarreia leve a sanguinolenta, e em casos mais severos a síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e morte (DEBROY; MADDOX, 2001; FAÚLA, 2016; KIFLU et al., 2017).

Além dos casos de *E. coli* diarreio gênica por DTA, um fator que ameaça a Saúde Pública diz respeito do uso indiscriminado e arbitrário de antimicrobianos no tratamento de doenças humanas e animais. Esta prática tem impactado diretamente no surgimento de bactérias resistentes (BÉLANGER et al., 2011; VEGA-MANRIQUEZ et al., 2020).

A descoberta revolucionária dos antibióticos poupou milhões de vidas. Doenças que no passado eram a causa comum de mortes em pacientes, foram tratadas com êxito após a introdução dos antimicrobianos, reduzindo as taxas de mortalidade e morbidade. A penicilina é o antibiótico mais utilizado no mundo, mas infelizmente, anos mais tarde surgiram os primeiros relatos de resistência ao princípio ativo (HUTCHINGS et al., 2019; GAYNES, 2017).

Os antimicrobianos são o pilar da saúde pública, ainda que milhões de pessoas venham se beneficiando de forma curativa ou preventiva, direta ou indireta, frente aos agentes antimicrobianos, o emprego inadequado ou não racional, aumenta a pressão seletiva para estirpes multirresistentes. A resistência a múltiplas drogas resulta em baixa eficácia de antibacterianos, o tratamento torna-se oneroso, difícil e em muitos casos, a resistência abrange o repertório dos agentes terapêuticos disponíveis, tornando-se um desafio e até mesmo impossível o tratamento de pacientes (VILA et al., 2016; FAÚLA, 2016; JARLIER et al., 1988).

Outro impacto é o uso exagerado de antimicrobianos que resulta na contaminação do ambiente (VILA et al., 2016). Ao acumular no solo, os resíduos antimicrobianos podem ser transportados através do escoamento superficial, ou pelo processo de lixiviação, em que são carregados para os corpos hídricos. Além do mais, os resíduos presentes no solo, podem ser absorvidos nos tecidos de origem vegetal para consumo, tornando, por este motivo, estes alimentos um risco a saúde humana (PUVAČA; FRUTOS, 2021). Por ano, estima-se que 2 milhões de pessoas sejam acometidas por patógenos bacterianos que apresentam resistência a algum tipo de antimicrobiano, e deste grupo, cerca de 23.000 morrem devido a multirresistência (THUNGRAT et al., 2015; TORRES, 2017).

A *E. coli* apresenta grande relevância na microbiologia médica, uma vez que tem a capacidade de provocar infecções graves em humanos e animais. Desta forma, diversos patótipos de *E. coli* são considerados um reservatório importante de genes de resistência a antimicrobianos que podem ser encarregados por falhas de tratamento em humanos e na medicina veterinária (PUVAČA; FRUTOS, 2021; TORRES, 2017; SALGADO-CAXITO et al., 2021; CARVALHO et al., 2016; TOOMBS-RUANE et al., 2020).

A literatura científica oferece uma abundância de relatos de pesquisa sobre o comportamento dos mecanismos de resistência, porém mais estudos são necessários (SELLERA et al., 2018). Devido as suas particularidades, a *E. coli* oferece um parâmetro atual de resistência antimicrobiana; a detecção beta-lactamase de espectro estendido (ESBLs), carbapenemases ou mecanismos de resistência à quinolona mediada por plasmídeo (PMQR) são destacados como os principais exemplos de mecanismos de resistência (VILA et al., 2016).

A capacidade do microrganismo produzir enzimas que inativem a ação dos antimicrobianos está cada vez mais comum, a produção de ESBL dificulta o

tratamento de infecções, pois as beta-lactamases degradam os antibióticos beta-lactâmicos (JARLIER et al., 1988; TOOMBS-RUANE et al., 2020).

Nos últimos anos, um crescente número de genes de resistência de *E. coli*, tem sido identificado, o que representa um sério problema em escala global, pois os fatores que aceleram este processo ainda são pouco conhecidos. Por fazer parte da microbiota intestinal, ao ter contato com os demais microrganismos que compartilham o mesmo ambiente de vida, é capaz de transferir ou adquirir traços genéticos resistentes de outras bactérias (PUVAČA; FRUTOS, 2021; YURI et al., 1999; OBENG et al., 2012; DERAKHSHANDEH et al., 2018).

4 IMPORTÂNCIA EM ANIMAIS DE COMPANHIA

A importância de *E. coli* em animais de companhia se dá pela manifestação de afecções entéricas e geniturinárias. Há relatos de casos de infecção uterina e do trato urinário em cadelas com a linhagem de *E. coli* patogênica de origem entérica (SIQUEIRA et al., 2009). Por sua versatilidade e potencial patogênico, *E. coli* é caracterizada por acometer uma ampla gama de hospedeiros (CARVALHO et al., 2016).

Famílias modernas tem como parte integrante da família os animais de estimação. Como citado anteriormente, a *E. coli* habita na microbiota normal do trato gastrointestinal de humanos, animais de sangue quente, inclusive animais de companhia. Neste contexto, há uma preocupação quanto a potencial possibilidade do compartilhamento de bactérias comensais e multirresistentes entre animais de estimação e seus tutores (DERAKHSHANDEH et al., 2018).

A cada ano, a população de cães e gatos tem aumentado, e desta forma, o estreito vínculo entre humanos e animais de companhia propicia oportunidades de intercâmbio de microrganismos, dentre eles patógenos. Os animais de companhia podem ser considerados sentinelas de resistência no ecossistema humano, cães demonstraram a capacidade de ser fonte potencial de cepas multirresistentes de *E. coli* (CARVALHO et al., 2016; GRINBERG et al., 2017; KARKABA et al., 2019).

A literatura aponta o compartilhamento de clones, bem como a transmissão de interespecies de *E. coli*, em um ambiente onde habitam animais de estimação e seres humanos. Os cães podem adquirir e compartilhar *E. coli* resistente a antimicrobianos

com humanos, sendo um reservatório potencial para *E. coli* patogênica que causam ITU no homem (HARADA et al., 2012; JOHNSON et al., 2008; STENSKE et al., 2009; GUARDABASSI, et al., 2004).

Além disso, gatos sem quadros diarreicos são portadores potenciais de EPEC para humanos, dado ao seu estreito comportamento e proximidade à família e crianças, e com isso, a prevalência é expressivamente significativa (MORATO et al., 2009). Estudos analisaram os marcadores de virulência de cepas de EPEC humana, e de seus animais de companhia. Cepas enteropatogênicas de EPEC típicas, dificilmente são isoladas de animais, entretanto, os humanos são considerados o principal reservatório natural para este patógeno. Em contrapartida, cepas de EPEC atípicas estão presentes tanto em animais saudáveis quanto doentes. Logo, os animais foram considerados reservatórios e fonte de infecção de cepas de EPEC atípicas para humanos (MOURA et al., 2009).

O papel do animal de estimação como fonte de infecção de patógenos entéricos para humanos vem sendo discutido nos últimos anos, as cepas frequentemente relatadas de importância aos cães são EPEC e ETEC. (MORATO et al., 2009; ARAIS et al., 2018). A eliminação de fezes com *E. coli* por animais de companhia, representa uma importante fonte de transmissão zoonótica de patógenos. Além disso, a defecação incontrolável de animais com diarreia favorece a disseminação de *E. coli* para animais não diarreicos. É importante ressaltar, que os isolados de *E. coli* são potenciais reservatórios de genes de resistência antimicrobiana e a presença deste patógeno nas fezes de cães e gatos, representa risco a Saúde Pública (MORATO et al., 2009; VEGA-MANRIQUEZ et al., 2020; ALMEIDA et al., 2012; PUÑO-SARMIENTO et al. 2013).

Por outro lado, humanos também atuam como reservatório, existindo a possibilidade de que alguns animais, principalmente os animais de estimação, contraíam cepa de EPEC por meio de fezes humanas (MORATO et al., 2009).

5 DIAGNÓSTICO

Existem diversas metodologias utilizadas como ferramenta de diagnóstico para a colibacilose, baseadas em métodos diretos com o objetivo de identificar o agente, através do cultivo microbiológico, ou pela detecção de anticorpos, por meio de

técnicas sorológicas, sendo este, métodos indiretos. A caracterização bioquímica, como também a caracterização de sorogrupos e sorotipos são utilizadas para identificar as linhagens de *E.coli*. (GREENE et al., 2015; MEGID et al., 2016).

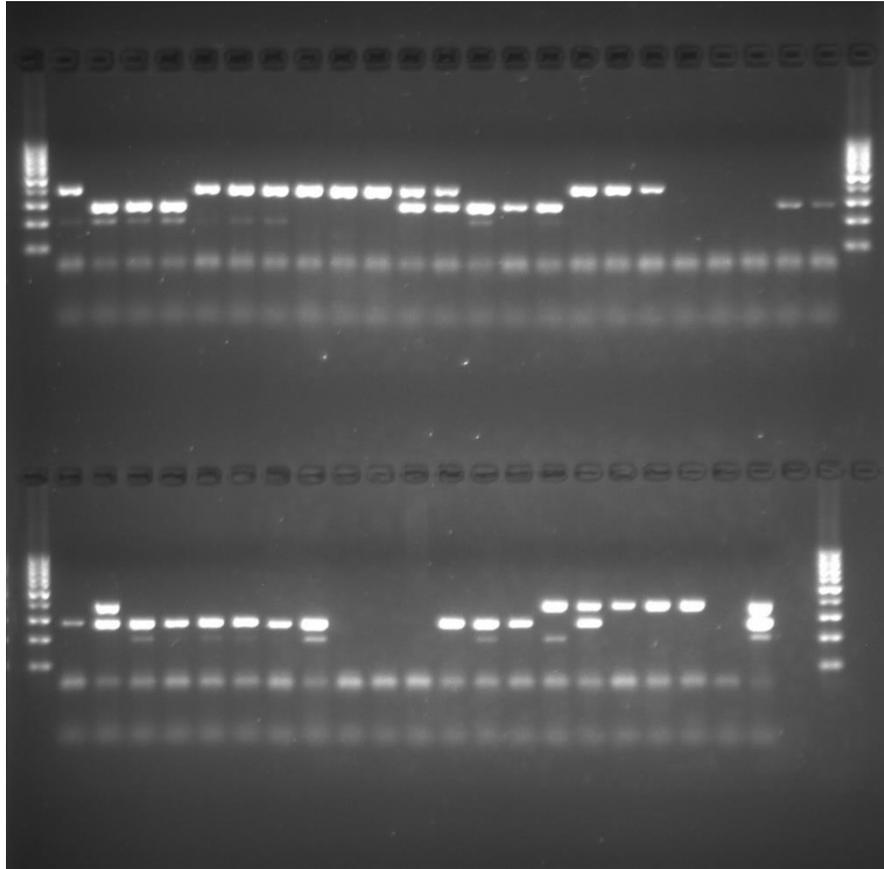
Em animais com manifestações entéricas, o cultivo bacteriológico é o diagnóstico de eleição para o diagnóstico das infecções por *E. coli*. Algumas medidas importantes devem ser tomadas com o material coletado, podendo elas influenciar na presença da bactéria nas amostras. Utilizando-se luvas de palpação, recomenda-se coletar as fezes diretamente do reto (aproximadamente 50g), após a coleta, manter o material em condições de refrigeração (4 a 8°), e encaminhar ao diagnóstico laboratorial, para a pesquisa dos principais enteropatógenos (bacterianos, parasitários e virais) que acometem os animais (DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2016).

Para o isolamento de bactérias entéricas, também é possível realizar a coleta de fezes com o auxílio de *swabs*, entretanto, por este meio se obtém uma pequena quantidade de material, limitando o diagnóstico simultâneo de enteropatógenos virais, bacterianos e parasitários. Nos casos de infecções extraentéricas, amostras de sangue, liquor, urina, lavado transtraqueal, líquido sinovial, órgãos, raspado de pele, secreção de conduto auditivo, uterina e leite são destinados ao cultivo microbiano (MEGID et al., 2016).

Após o isolamento e a identificação, é realizada a caracterização dos fatores de virulência das amostras. Conhecer a composição genética da bactéria é uma importante contribuição para os estudos da epidemiologia molecular, sendo possível compreender os fatores de virulência e os mecanismos patogênicos do agente, o entendimento desses mecanismos, proporcionam melhor o desenvolvimento de específicas ferramentas de diagnósticos para identificar e categorizar os diferentes patótipos de *E. coli* (BOUZARI; JAFARI; ASLANI, 2012).

O “método de Clermont” (figura 1) permite identificar e classificar as amostras de *E. coli* em filogrupos. No ano de 2000, o emprego deste método rápido e simples proporcionou o uso da tipagem filogenética utilizando a técnica de PCR. Em 2013, este método foi aperfeiçoado, através da PCR quadruplex. Com a padronização do MLST (*multi-locus sequence typing*), tornou-se possível identificar sete filogrupos; embora o teste possa ser utilizado para identificar diversidade genética de *E. coli*, a MLST consiste em uma técnica laboriosa e de custo elevado (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; CLERMONT et al., 2013; CLERMONT et al., 2019).

Figura 1 – Perfis Quadruplex PCR do novo método de filotipagem de “Clermont”.



Fonte: Imagem cedida gentilmente pela Doutora Natália Carrillo Gaeta (2021)

O Teste de susceptibilidade bacteriana e caracterização fenotípica de isolados de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) por teste aproximação dos discos (“Double-Disk Screening”) são utilizados para a confirmação do fenótipo de de *E. coli* com beta-lactamase de espectro estendido (BSL) (Jarlier et al. 1988). O emprego das técnicas moleculares, poupam o inconveniente uso de animais de laboratório, utilizados nas provas clássicas, além de possibilitar a detecção de toxinas e demais fatores de virulência, favorecendo assim, o avanço no conhecimento da epidemiologia, patogenicidade e diagnóstico do agente (DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2016).

6 JUSTIFICATIVA

Na medida que os anos foram passando, a domesticação de cães e gatos tornou a convivência do homem cada vez mais próxima e afetuosa com os animais de companhia, desta forma, o aumento crescente da população de cães e gatos e o estreito vínculo entre estes animais e seres humanos, favorecem a ocorrência de doenças zoonóticas.

Estudos destacam o compartilhamento de clones, bem como a transmissão de interespecies de *E. coli*, em um ambiente onde habitam animais e estimação e seres humanos. Os humanos também podem atuar como reservatórios, existindo a possibilidade de que alguns animais, principalmente os animais de companhia, contraíam cepa de *E. coli* patogênicas.

Alguns isolados de *E. coli* são potenciais reservatórios de genes de resistência antimicrobiana e a presença deste patógeno nas fezes de cães e gatos, representa risco a Saúde Pública, o papel dos animais de companhia vem sendo discutido nos últimos anos, pois podem atuar tanto como elos epidemiológicos ou sentinelas de *E. coli* patogênicas ou multirresistentes a antimicrobianos.

Em vista do exposto, considerando as importâncias levantadas, por existirem poucos trabalhos epidemiológicos no Brasil com pequenos animais, este estudo tem como justificativa que o monitoramento dos seres humanos e animais de companhia, juntamente com os dados sobre a epidemiologia, o conhecimento sobre as características genotípicas, fatores de virulência, distribuição filogenética de amostras de *E. coli* e resistência aos antimicrobianos, são dados que contribuirão para medidas de controle e de transmissão interespecies, reduzindo o impacto da *E. coli* e conseqüentemente a melhoria da Saúde Pública.

7 OBJETIVOS

Caracterizar de isolados de *E. coli* provenientes de amostras de fezes de cães e gatos enviadas para coproparasitológico

Objetivos Específicos

- Identificar os patotipos dos isolados de *E. coli*
- Identificar os fatores de virulência dos isolados de *E. coli*
- Verificar o perfil fenotípico de sensibilidades aos antibióticos
- Verificar a presença de isolados com o perfil fenotípico beta-lactamase de espectro estendido

8 MATERIAIS E MÉTODO

8.1 Caracterização das amostras

Foram processadas fezes de cães e de gatos, que foram enviadas a um laboratório particular sediado na cidade de Botucatu, para o exame coproparasitológico no período compreendido entre março a outubro de 2021. Após o exame realizado, as amostras foram doadas para a realização do isolamento de *E. coli*. Foram utilizadas fezes de 35 animais, sendo 3 felinos, 31 cães e 2 que não foi possível a identificação da espécie. A amostragem foi de conveniência.

8.2 Isolamento bacteriano

Foi realizado o esgotamento da amostra de fezes em meio seletivo de ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 18 a 24h. Três colônias lactose positivas e com morfologia compatível com *E. coli* foram selecionadas ao acaso e semeadas em ágar sangue por 24 horas. As colônias foram armazenadas em ágar nutriente e estocadas em temperatura ambiente. Para a realização dos fatores de virulência e caracterização dos filogrupos, os isolados foram armazenados em Tris-EDTA pH 7,4 (TE, 0,1M Tris, 0,01M EDTA) e congelados a -20°C.

8.3 Identificação das colônias

A identificação dos isolados foi realizada através da espectrometria de Massa por ionização com dessorção à laser assistido por matriz e analisador de tempo de voo (MALDI-TOF MS).

8.4 Identificação do filogrupo

Os isolados foram agrupados nos filogrupos A, B1, B2, C, D e F utilizando uma PCR direcionada para os genes arpA, chuA, yjaA, TspE4 (Clermont et al., 2013).

8.5 Caracterização dos fatores de virulência

Os seguintes genes de fatores de virulência foram pesquisados: *stx1*, *stx2*, *eae*, *aggR*, *cnf1* e *cnf2*, utilizando os protocolos descritos por Franck et al (1998), Tokuda et al (2010) e Blanco et al (1996). Os isolados foram classificados em patótipos de acordo com a presença dos genes: i. STEC (gene *stx*), ii. EHEC (genes *stx* mais *eae*), iii. EPEC (gene *eae*), iv. EAEC (gene *aggR*) e v. NTEC (gene *cnf*) (Coura et al 2014). As amostras de *E. coli* de referência foram DL933 (*eaeA*, *stx1*, *stx2*, *ehxA*, *iha*, *toxB*, *efa1*), EAEC O42 (*astA*, *aggR*, *aaf*, *pet*) e S5 (*cnf*).

8.6 Teste de susceptibilidade bacteriana

Os isolados bacterianos foram testados para suscetibilidade microbiana através do método de disco difusão de acordo com o guia *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017 e CLSI, 2020). Os discos de antibióticos utilizados foram: cefoxitina 30 µg (CFO); ciprofloxacina 5 µg (CIP), gentamicina 10 µg (GEN), sulfametoxazol 23,5 µg/trimetropim 1,25 µg (SUT), amicacina 30 µg (AMI), ertapenem 10 µg (ERT), enrofloxacin (ENO), tetraciclina 30 µg (TET).

8.7 Caracterização fenotípica de isolados de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) por Teste aproximação dos discos (“Double-Disk Screening”)

Foi realizado o teste de aproximação dos discos para a triagem de *E. coli* com beta-lactamase de espectro estendido (BSL) (Jarlier et al. 1988). O método constituiu da utilização da prova de disco de difusão de cefotaxima, cefepime, ceftazidima, e ceftriaxona com um disco central contendo um inibidor de β-lactamase (amoxicilina/ácido clavulânico). Os discos foram colocados a uma distância de aproximadamente 20 mm, em relação ao disco contendo o inibidor de β-lactamase. O teste foi considerado positivo quando foi observado a “*zona fantasma*” entre um dos discos externos e o central (amoxicilina/ácido clavulânico).

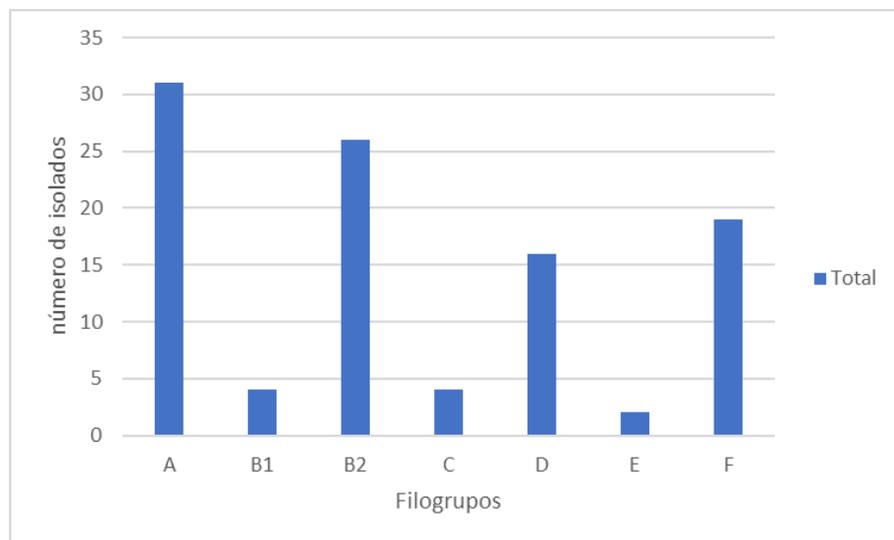
8.8 Análise Estatística

Para a análise dos dados foi utilizada uma estatística descritiva, com auxílio de planilha eletrônica utilizando o programa Microsoft Office 365 Excel.

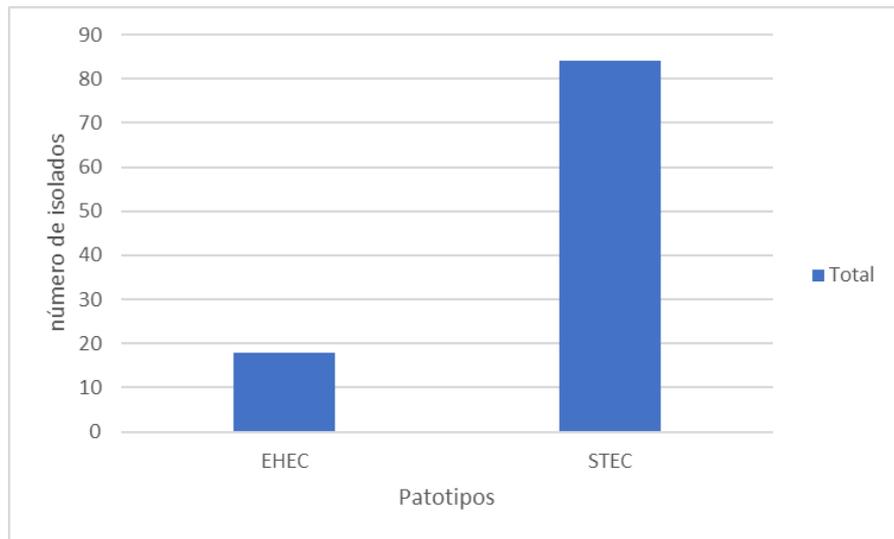
9 RESULTADOS

Foram analisados 102 isolados de *E. coli* provenientes de cães e gatos, desses 30,4% (31/102) pertenciam ao filogrupo A, 25,5% (26/102) pertenciam ao filogrupo B2, 18,6% (19/102) ao F, 15,7% (16/102) ao filogrupo D, 3,9% ao B1 (4/102) e C (4/102) e 2% (2/102) ao E (Gráfico 1).

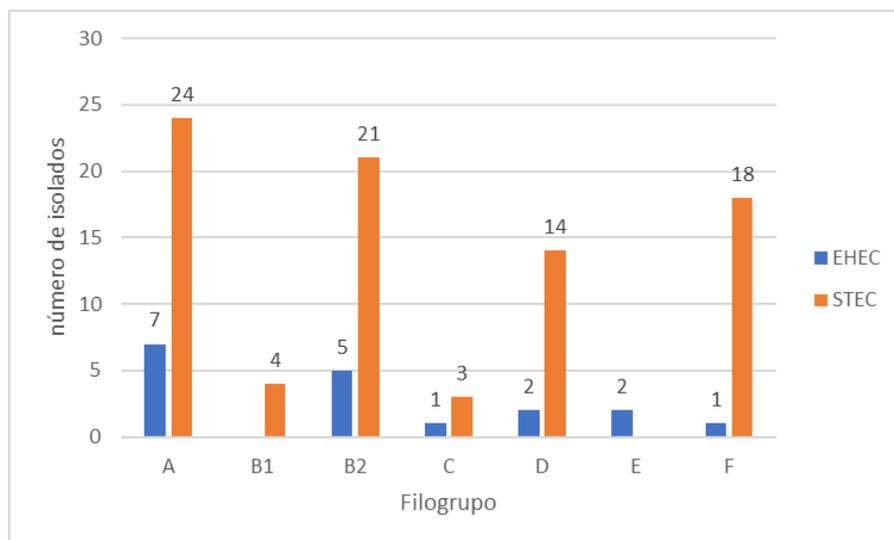
Gráfico 1. Distribuição dos isolados de *E. coli* de acordo com os filogrupos



Em relação aos fatores de virulência foram identificados os patotipos STEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga) e EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), sendo encontrado 84 isolados classificados como STEC e 18 isolados como EHEC (Gráfico 2).

Gráfico 2. Distribuição dos isolados de *E. coli* de acordo com os patótipos

A distribuição entre Filogrupo e Patótipo pode ser observada no gráfico 3.

Gráfico 3. Distribuição dos isolados de *E. coli* de acordo com os patótipos e filogrupos

Dos 31 isolados pertencentes ao Filogrupo A, todos apresentaram a presença do gene *stx2* e 7 o gene *aea*. Quatro isolados apresentaram fenótipo de beta lactamase de espectro estendido. Os 31 isolados foram sensíveis a cefaloxitina, 22 foram sensíveis (S) a ciprofloxacina, 4 demonstraram sensibilidade intermediária (I) e

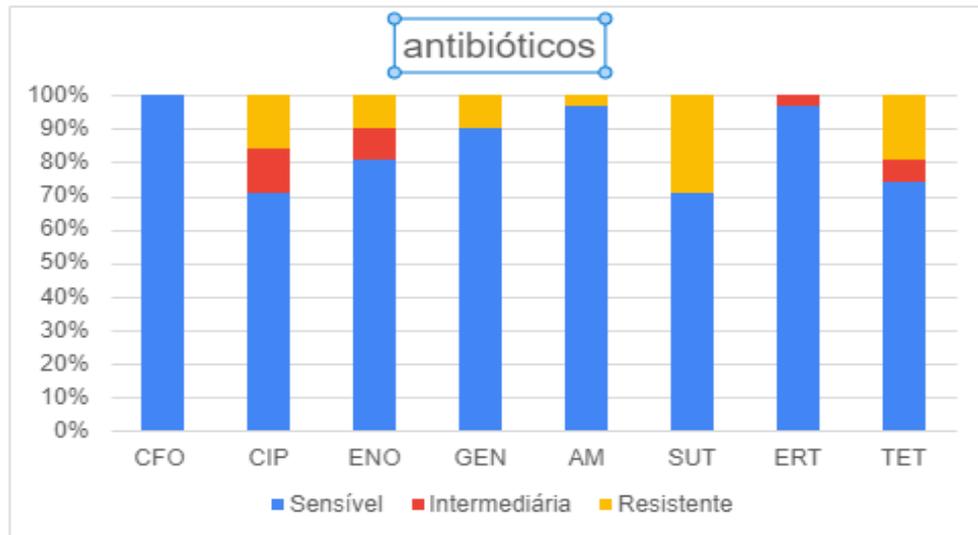
31	-	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-
45	-	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-
53	+	S	R	I	S	S	R	S	S	+	-
54	-	S	S	S	S	S	R	S	S	+	-
55	+	S	I	S	S	S	R	S	S	+	-
58	-	S	I	I	S	S	R	S	R	+	-
65	-	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-
68	-	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+
71	-	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+
78	-	S	R	R	R	S	R	S	R	+	-
81	-	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-
85	-	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-
86	-	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-
87	-	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-
100	-	S	I	S	S	S	R	S	R	+	-
102	-	S	I	I	S	R	S	I	R	+	-

A Tabela 1 e o Gráfico 4 mostram a frequência relativa do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados pertencentes ao Filogrupo A

Tabela 1 - Frequência relativa em porcentagem do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados obtidos de cães e gatos do Filogrupo A

Perfil (%)	Antibióticos								
	CFO	CIP	ENO	GEN	AM	SUT	ER	TET	T
Sensível	100	71	80	90	97	71	97	74	
Intermediário	0	13	10	0	0	0	3	6	
Resistente	0	16	10	10	3	29	10	19	

Gráfico 4 - Frequência relativa do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados obtidos de cães e gatos pertencentes ao filogrupos A



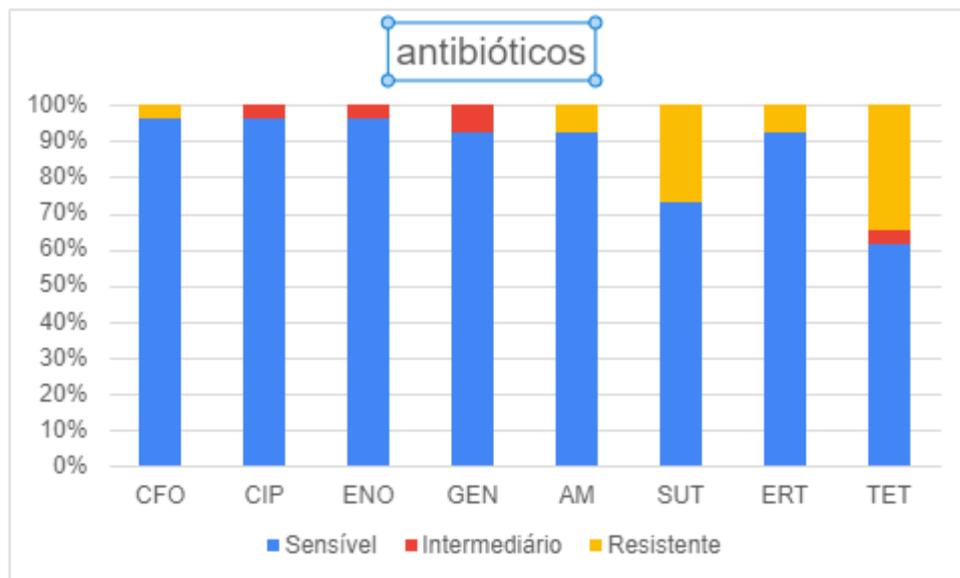
Vinte e seis isolados do Filogrupos B2 apresentaram a presença do gene *stx2* e em quatro foi detectado a presença do gene *aea*. Vinte e cinco isolados foram sensíveis e um resistente a cefaloxitina; 25 foram sensíveis e um apresentou sensibilidade intermediária a ciprofloxacina; 25 apresentaram sensibilidade e 1, intermediário a enrofloxacin; 24 foram classificados como sensíveis e 2 foram intermediários a gentamicina; 24 foram sensíveis e 2, resistentes a amicacina; 19 sensíveis e 7 resistentes ao sulfametrazol/trimetopim; 24 foram sensíveis e 2 resistentes ao ertapenem; 15 foram sensíveis, 1 demonstrou sensibilidade intermediária e 9 foram resistentes a tetraciclina (Quadro 2). As linhas sequenciais com as mesmas cores representam os isolados de um único animal. Os isolados identificados como 44, 62, 64 são de felinos, os demais são de cães.

Na Tabela e gráfico 5 estão demonstradas as frequências relativas do perfil de sensibilidade antimicrobiana do filogrupo B2.

Tabela 2 - Frequência relativa em porcentagem do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados obtidos de cães e gatos do Filogrupo B2

Perfil (%)	Antibióticos							
	CFO	CIP	ENO	GEN	AM	SUT	ERT	TET
S	96	96	96	92	92	73	92	62
I	0	4	4	8	0	0	0	4
R	4	0	0	0	8	27	8	35

Gráfico 5 - Frequência relativa do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados obtidos de cães e gatos pertencentes ao filogrupo B2



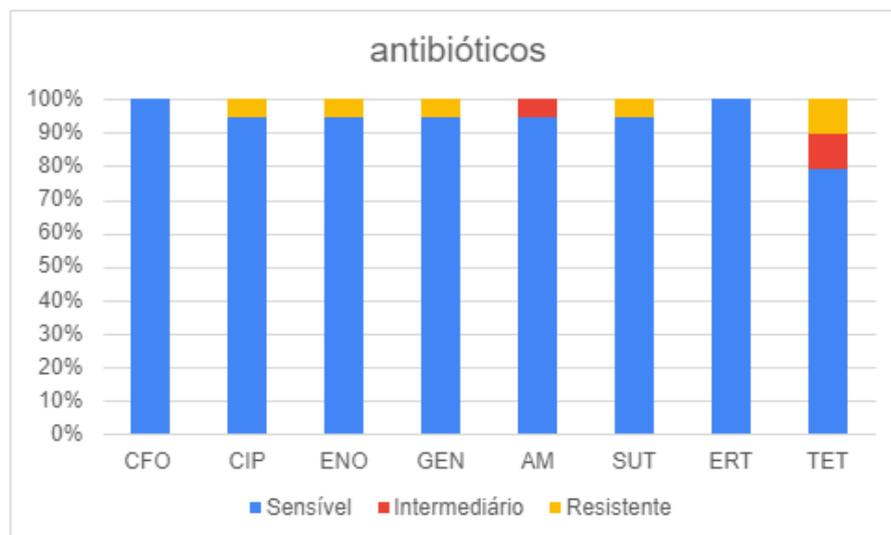
Dos isolados pertencentes ao Filogrupo F, 18 apresentaram a presença do gene *stx2* e 1, o gene *aea*. Os 19 isolados foram sensíveis a cefaloxitina, e ao ertapenen; 18 sensíveis e um resistente a ciprofloxacina, a enrofloxacina, a gentamicina e a associação de sulfametrazol/trimetropim; 15 apresentaram

Na Tabela e Gráfico 6 estão representadas as frequências relativas dos perfis de sensibilidade dos isolados do Filogrupo F

Tabela 3 - Frequência relativa do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados obtidos de cães e gatos do Filogrupo F

Perfil (%)	Antibióticos							
	CFO	CIP	ENO	GEN	AM	SUT	ERT	TET
S	100	95	95	95	95	95	100	79
I	0	0	0	0	5	0	0	11
R	0	5	5	5	0	5	0	11

Gráfico 6 - Frequência relativa do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados obtidos de cães e gatos pertencentes ao filogrupo F



Os isolados do Filogrupo D apresentaram 100% de sensibilidade a cefaloxitina (16/16); 15 foram sensíveis e 1 resistente aos antibióticos ciprofloxacina, enrofloxacina, gentamicina, amicacina e ertapenem. Dez isolados foram sensíveis e 6 resistentes a associação de sulfametrazol/trimetopim e 6 apresentaram sensibilidade, 8 resistentes e 2 sensibilidades intermediária para a tetraciclina. Dois isolados apresentaram os dois genes de virulência (*stx2* e *eae*), os demais apenas o gene *stx2*

(Quadro 4). As linhas em sequência com as mesmas cores representam os isolados de um único animal. Os isolados identificados como 50, 51 e 52 não foi possível definir a espécie animal, os demais isolados são provenientes de cães.

Quadro 4 – Perfil de virulência e sensibilidade microbiana dos isolados de cães e gatos pertencentes ao Filogrupa D. São Paulo, 2021

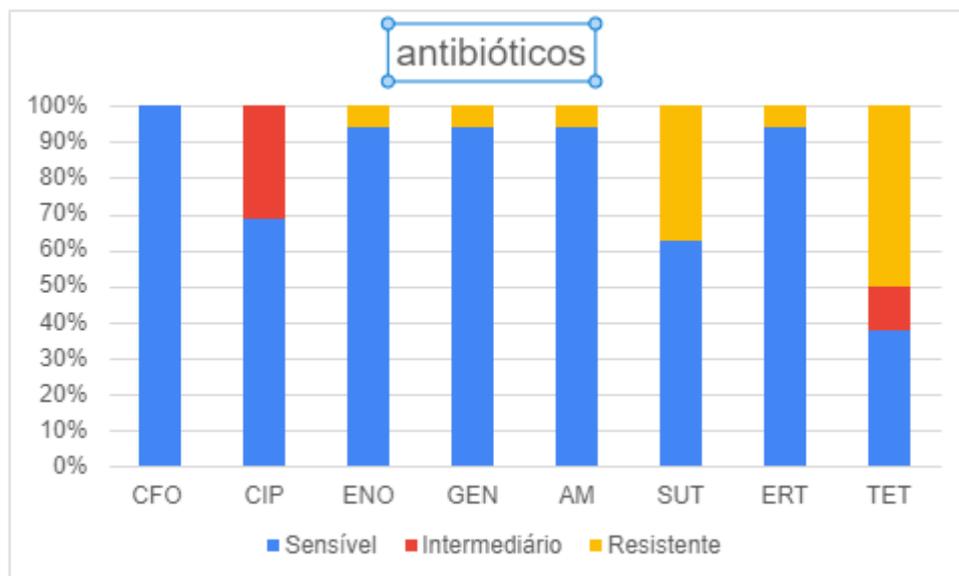
ID	BSL	antibióticos								Gene para fator de virulência	
		CF O	CI P	ENO	GEN	AMI	SUT	ERT	TET	<i>stx2</i>	<i>eae</i>
12	-	S	S	S	S	S	S	S	R	+	-
33	-	S	S	S	S	S	R	S	R	+	-
34	-	S	S	S	S	S	R	S	R	+	-
35	-	S	S	S	S	S	R	S	R	+	-
36	-	S	S	S	S	S	R	S	R	+	-
37	-	S	S	S	S	S	R	S	R	+	-
38	-	S	S	R	S	S	S	S	S	+	-
39	-	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-
40	-	S	I	S	S	S	S	S	S	+	-
50	-	S	I	S	S	S	S	S	S	+	-
51	-	S	I	S	S	S	S	S	S	+	+
52	-	S	I	S	S	S	S	S	S	+	-
82	-	S	S	S	S	S	S	S	R	+	+
83	-	S	S	S	S	S	S	S	I	+	-
84	-	S	S	S	S	S	S	S	I	+	-
10	-	S	I	S	R	R	R	R	R	+	-
1											

A tabela 4 e o gráfico 7 mostram a frequência relativa do perfil de sensibilidade dos antimicrobianos utilizados dos isolados do filogrupa D.

Tabela 4 - Frequência relativa do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados obtidos de cães e gatos do Filogrupos D

Perfil (%)	Antibióticos							
	CFO	CIP	ENO	GEN	AM	SUT	ERT	TET
S	100	69	94	94	94	63	94	38
I	0	31	0	0	0	0	0	13
R	0	0	6	6	6	38	6	50

Gráfico 7 - Frequência relativa do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados obtidos de cães e gatos pertencentes ao filogrupos D.



Tanto os isolados do filogrupos B1 quanto do E foram sensíveis a todos os antibióticos testados e não apresentaram o padrão fenotípico de beta-lactamase estendida. Os isolados do filogrupos B1 apresentaram a presença do gene *stx2*, mas não do *eae*, ao contrário dos isolados do filogrupos E que apresentaram os dois genes. Todos os isolados foram provenientes de cães, 3 indivíduos para o B1, sendo que um tem dois isolados e 2 para o E, cada animal com um isolado.

Dos quatro isolados pertencentes ao filogrupos C, 2 apresentaram sensibilidade aos antibióticos testados e 2 foram resistentes a ciprofloxacina, a enrofloxacin, a gentamicina, associação de sulfametaxol e trimetropim e a tetraciclina. Três isolados apresentaram a presença do gene *stx2* e apenas um, o *eae*. O isolado 46 foi

proveniente de 1 felino e os demais de cães. A utilização das mesmas cores em linhas sequenciais indica o mesmo animal (Quadro 5).

Quadro 5 – Perfil de virulência e sensibilidade microbiana dos isolados de *E. coli* de cães e gatos pertencentes ao Filogrupos C. São Paulo, 2021

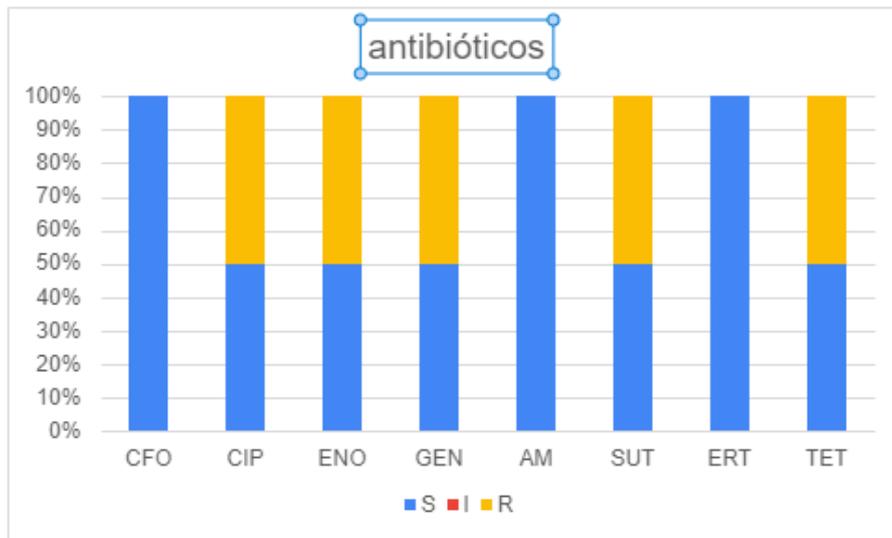
ID	BSL	antibióticos								Gene para fator de virulência	
		CF O	CI P	ENO	GEN	AMI	SUT	ERT	TET	<i>stx2</i>	<i>eae</i>
46	-	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-
70	-	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-
76	-	R	R	R	R	S	R	S	R	+	-
77	-	R	R	R	R	S	R	S	R	+	-

Na tabela 5 e gráfico 8 estão relacionadas as frequências relativas dos perfis de sensibilidade antimicrobiana dos isolados do filogrupos C

Tabela 5 - Frequência relativa do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados de *E. coli* obtidos de cães e gatos do Filogrupos D

Perfil (%)	Antibióticos							
	CFO	CIP	ENO	GEN	AM	SUT	ERT	TET
S	100	50	50	50	100	50	100	50
I	0	0	0	0	0	0	0	0
R	0	50	50	50	0	50	0	50

Gráfico 8 - Frequência relativa do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados de *E. coli* obtidos de cães e gatos pertencentes ao filogrupo C

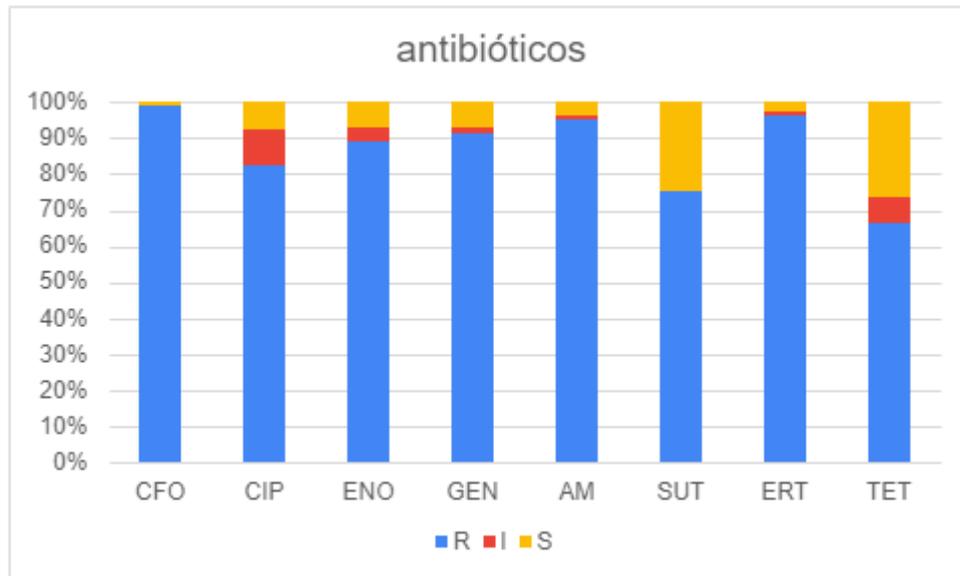


A tabela 6 e o gráfico 9 ilustram o perfil de resistência aos antibióticos dos isolados obtidos de cães e gatos de amostras de fezes enviadas para coproparasitológico entre março a setembro de 2021. Dos 102 isolados, 99% apresentaram sensibilidade a cefoxitina (CFO) (betalactâmico), 82% ao ciprofloxacino (CIP) e 89% a enrofloxacina (ENO) (quinolonas/fluorquinolona), 91% a gentamicina (GEN) e 95% a amicacina (AM) (aminoglicosídeos), 75% a associação de sulfametaxazol/tripetropim (SUT) (antagonistas da cadeia folato), 96% ao ertapenem (ERT) (carbapenem) e 67% a tetraciclina (TET) (tetraciclina).

Tabela 6 - Frequência relativa do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados de *E. coli* obtidos de cães e gatos independente do patótipo e do filogrupo

Perfil (%)	Antibióticos							
	CFO	CIP	ENO	GEN	AM	SUT	ERT	TET
Sensível	99	82	89	91	95	75	96	67
Intermediário	0	10	4	2	1	0	1	7
Resistente	1	8	7	7	4	25	3	26

Gráfico 9 - Frequência relativa do perfil de sensibilidade microbiana dos isolados de *E. coli* obtidos de cães e gatos independente do patotipo e do filogrupo



Os perfis dos isolados resistentes encontrados estão relacionados no Quadro 6. Os isolados que apresentaram padrão de multirresistência para os antibióticos testados estão relacionados no Quadro 7. Para esse trabalho, os perfis intermediários foram considerados como resistentes. Foi considerado um isolado multirresistente aquele que apresentou resistência a pelo menos 3 classes de antibióticos (Magiorakos et al 2011).

Tabela 7 - Frequência absoluta dos perfis fenotípicos de resistência aos antibióticos testados dos isolados de *E. coli* provenientes de cães e gatos

N de isolados	Perfil fenotípico de resistência
6	CIP
2	SUT
11	TET
1	ENO
11	SUT-TET
1	CIP-SUT
1	AMI-TET

1	CIP-GEN-SUT
1	CIP-SUT-ENO
1	CIP-SUT-TET
1	CIP-SUT-ENO-TET
1	CIP-AMI-ENO-TET
1	GEN-AMI-ERT-TET
3	CIP-GEN-SUT-ENO-TET
1	CIP-GEN-SUT-AM-ENO-TET
1	CIP-AMI-ERT-ENO-TET
1	CIP-GEN-AMI-SUT-ERT-TET
1	CFO-GEN-AMI-SUT-ERT-TET

Tabela 8 – Isolados de *E. coli* com perfil multirresistente provenientes de fezes de animais de companhia. São Paulo 2022

ID	FG	antibióticos							
		CFO	CIP	ENO	GEN	AMI	SUT	ERT	TET
1	F	S	R	R	R	S	R	S	I
2	A	S	R	S	R	R	R	S	R
3	A	S	R	S	R	S	R	S	S
59	B2	R	S	S	I	R	R	R	R
77	C	S	R	R	R	R	R	S	R
78	A	S	R	R	R	S	R	S	R
94	B2	S	S	S	I	R	S	R	R
101	D	S	S	S	R	R	R	R	R

ID =identificação, FG=Filogrupo, CFO=beta lactâmico; CIP e ENO = quinolona/fluorquinolona, GEN e AMI = aminoglicosídeos, SUT = antagonistas da cadeia folato, ERT = carbapenem; TET = tetraciclina

No Quadro 8 estão relacionados os isolados que apresentaram o espectro de EBLS (Figura 2) e o perfil de sensibilidade microbiana

Figura 2 – Foto de um isolado ESBL positivo, mostrando o perfil fantasma



Fonte (Adaptado de JARLIER et al., 1988)

Tabela 9 – Perfil de sensibilidade microbiana dos isolados EBLTs *E. coli*

isolad	antibióticos							
	CFO	CIP	GEN	SUT	AMI	ERT	ENO	TET
o								
1	S	R	R	R	S	S	R	I
2	S	R	R	R	S	S	R	I
3	S	R	R	R	S	S	R	R
55	S	R	S	R	S	S	S	S

10 DISCUSSÃO

Esse trabalho foi realizado com amostras fecais submetidas para diagnóstico coproparasitológico num laboratório particular, na cidade de Botucatu, SP. Após a realização dos exames, essas amostras foram doadas para a realização do isolamento bacteriano. A limitação dos resultados desse trabalho reside no fato das amostras não terem sido colhidas diretamente do reto dos animais e, eventualmente, pode não refletir no estado de infecção animal e sim a contaminação ambiental, além de ser um estudo transversal por amostragem de conveniência com um número pequeno de isolados, o que não permite a extrapolação dos dados para população. Não pode ser descartado também, frequência superestimada dos dados encontrados, pois como foram colhidas três bactérias do mesmo animal, pode haver clones bacterianos.

Diversos patótipos já foram isolados de fezes de cães, tanto com como sem diarreia, entre eles: EPEC, ETEC, EHEC, NTEC, EIEC, EAEC e AIEC, conseqüentemente o papel destes patótipos na causa da diarreia em cães é controverso (MARKS ET AL 2011). RAMOS et al (2021) pesquisando enteropatógenos em cães com diarreia no Brasil verificaram que o principal agente etiológico foi o Parvovirus canino e somente detectaram 3 amostras positivas para *E. coli*, sendo 2 isolados EPEC e 1 ETEC. No presente estudo, foram identificados os genes *stx2* em 102 isolados e *eae* em 18, que permitiu classificá-los nos patótipos STEC e EHEC. Coura et al (2018) também não encontraram associação entre patótipos e diarreia e detectaram os patótipos EPEC e NTEC. Neste estudo não foi detectado em nenhuma amostra os genes *cnf1* e *cnf2*, que configuram a existência do patótipo NTEC, já Ramos (2019) encontrou *cnf1* em 86,6% dos isolados mostrando associação com dietas cruas, um achado muito superior aos encontrados no presente trabalho e também por outros estudos (COURA ET AL., 2018; DERAKHSHANDEH ET AL., 2018).

Outro achado interessante foi que, neste estudo, não foi encontrado o patótipo EPEC, que tem sido implicado como um importante agente causador de diarreia em cães (ALMEIDA ET AL 2012; PUÑO-SARMIENTO ET AL 2013, COURA ET AL., 2018). Uma explicação possível para não termos identificado EPEC é que a maior parte das fezes trabalhadas foi considerada não diarreica (dados não mostrados).

Diferentemente de COURA et al (2018), RAMOS (2019) e RAMOS et al (2021) que ou não encontraram o gene de virulência *stx*, que caracteriza o patotipo STEC, ou recuperaram poucos isolados caracterizados como STEC, no presente estudo identificamos 82,35% dos isolados como STEC, todos positivos para o gene *stx2*, que é o mais prevalente (HAMMERMUELLER et al., 1995). RAMOS (2019) identificou apenas *stx1*, mas numa frequência muito baixa e em apenas em cães mantidos com dieta caseira. Apesar dos ruminantes serem os principais reservatórios naturais de STEC e EHEC (COURA et al 2014), cães também podem ser reservatórios destes patotipos (BENTANCOR et al., 2007), o que implica em problema de saúde pública, uma vez que o contato próximo entre cães e humanos aumenta o risco da transmissão zoonótica de *E. coli*. E os resultados do presente estudo, reforçam este aspecto, do cão como reservatório, pois STEC/EHEC foram os patotipos mais prevalentes.

No presente estudo, dos 102 isolados identificados, o filogrupo A aparece em maior frequência (30,4%), seguido dos filogrupos B2 (25,5%), F (18,6%), D (15,7%), B1 e C (3,9%), E (2%). Observa-se que os filogrupos A e B1, considerados comensais somam 34,3% dos isolados e os considerados virulentos (B2 e D) 41,2%, resultados semelhantes ao encontrados por VEGA-MANRIQUEZ et al (2020) e KARAHUTOVÁ et al (2021), além disso observamos que o patotipo STEC só não foi identificado no filogrupo E, sendo que os mais frequentes foram o filogrupo A, B e F. Já EHEC não foi encontrado no filogrupo B1. VEGA-MANRIQUEZ et al (2020) somente identificaram STEC no filogrupo B1 e em cães saudáveis e EHEC nos filogrupos A e B1, também em cães saudáveis e um isolado em B2. Um ponto importante tanto encontrado no presente estudo como por VEGA-MANRIQUEZ et al (2020) é a frequência similar de isolados dos filogrupos dos grupos A/B1 e B2/D em cães aparentemente saudáveis, pois cães saudáveis podem ser colonizados por isolados virulentos. Conseqüentemente há a sugestão que os cães podem ser reservatórios de amostras virulentas para humanos (ARAI et al 2015; VEGA-MANRIQUEZ et al 2020; KARAHUTOVÁ et al 2021).

Um outro ponto interessante é que encontramos a maior parte do espectro ESBL no filogrupo A (4), resultado semelhante ao obtido por KARAHUTOVÁ et al (2021) que identificaram uma maior prevalência de multidroga resistente (7) nos isolados do filogrupo A e em cães saudáveis.

A presença do filogrupo B2 como um dos mais frequentes também foi observado por outros autores (TENAILLON et al 2010; COURA et al. 2018; RAMOS

2019; VALAT et al 2020). VALAT et al (2020) que identificaram o filogrupo B2 como o mais prevalente (~80%) em todos os tipos de patologia, como infecção intestinal, respiratória, reprodutiva, otite, septicemia e também foi o filogrupo que apresentou mais isolados multiresistentes (50%). KARAHUTOVÁ et al (2021) também identificaram uma maior frequência de B2 em cães com diarreia (42,2%), mas apenas 3% em cães saudáveis, achado muito diferente do encontrado neste trabalho, onde a frequência de B2 em cães aparentemente saudáveis foi superior a 25%, reforçando a preocupação com a saúde pública, uma vez que amostras deste filogrupo são possivelmente virulentas para humanos.

Amostras do filogrupo F estão associadas a infecções extra intestinal em animais de companhia e humanos (LAU et al 2008; GUO et al 2015), além disso, sua importância aumenta pela relação com resistência a fluoroquinolona e a ESBL (VANGCHHIA et al 2016). No presente estudo, o filogrupo F foi o terceiro mais frequente, com 18,6%, sendo que um isolado apresentava o perfil ESBL. COURA et al (2018) não encontraram o filogrupo F em cães, mas RAMOS (2019) identificou 8,9% dos isolados como pertencentes ao filogrupo F, mas não encontraram nenhuma associação com diarreia ou comida caseira.

Considerando o perfil de sensibilidade dos isolados (102), 99% apresentaram sensibilidade a cefoxitina (99%), a gentamicina (91%), a amicacina (95%) e ao ertapenem (96%), por outro lado 26% foram resistentes a tetraciclina e 25% e a associação de sulfametaxazol/trimetropim, antibióticos de primeira geração (Tabela 6; Gráfico 6) utilizados na medicina veterinária (ANDRADE, 2017).

Todos os isolados pertencentes ao filogrupo A, onde se encontra a maior associação com isolados comensais, foram sensíveis a cefoxitina e apresentaram sensibilidade maior que 90% a gentamicina e amicacina (representantes dos aminoglicosídeos) e ao ertapenem; 70 a 80% de sensibilidade ao ciprofloxacino e enrofloxacina (representantes dos grupos das quinolonas/fluoroquinolona) e para associação de sulfametoxazol/trimetropim (antagonistas da cadeia folato) (Tabela 1, Gráfico 4). No filogrupo B2, associados a estirpes virulentas extra intestinais, foi observado que todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos utilizados nos testes *in vitro*, com maior resistência a tetraciclina e SUT e sensibilidade acima de 90% a CFO, CIP, ENO, GEN, AME e ERT. Todos os isolados pertencentes ao filogrupo B1 e E foram sensíveis a todos os antibióticos testados e o do C, sensíveis ao CFO e ER, esses foram os filogrupos com o menor número de

isolados. Comparações diretas de perfis fenotípicos de resistência com outros trabalhos realizados no Brasil ou fora, não são possíveis devido a diferenças metodológicas, desde o tipo de amostragem empregada aos antibióticos utilizados, mas variados perfis de resistência foram encontrados por ISHII et al (2011) em bactérias gram (-) isoladas de cistite no Paraná, dentre elas a *E. coli*, que apresentaram resistência superior a 66% aos antibióticos testados; por OSUGUI et al. (2014) testando *E. coli* extra intestinal; PUÑO-SARMIENTO et al., (2013), também no Paraná, detectaram isolados de *E. coli* EPEC resistentes com diferentes perfis de resistência aos antibióticos e MARIANI (2013), trabalhando com *E. coli* isoladas de cães com e sem diarreia do Mato Grosso de Sul ou por BOURNE et al. (2019), analisando *E. coli* de cães e gatos saudáveis na Austrália.

Os isolados que apresentaram fenótipo para o perfil de betalactamase estendido (Quadro 7) pertenciam ao filogruppo C e F, grupo relacionado a infecções extraintestinais e presente em todo mundo (SALGADO-CAXITO et al., 2021). Nesse trabalho não foram procurados os genes normalmente associados a esse fenótipo (SALGADO-CAXITO et al. 2021), apenas foi realizado o teste confirmatório do fenótipo de EBSL pelo teste de aproximação por disco (CSLI, 2017). Para fins epidemiológicos, as amostras com padrão de sensibilidade intermediária, foram consideradas resistentes, portanto, os isolados 1, 2 e 3 são multirresistentes, apresentando resistência para as quinolonas/fluorquinolona, aminoglicosídeos, aos antifólicos e as tetraciclinas, além das cefosporinas (figura 2). O isolado 55 apresentou resistência para quinolona e aos antifólicos, além das cefalosporinas. A presença de isolados multiresistentes para esse perfil já é esperado, pois eles tendem a carregar genes de resistência plasmidial para outras classes de antibióticos (SOUZA et al., 2012).

As ESBL- *E. coli* já foram descritas em diversos espécimes clínicas, em animais saudáveis e doentes (BORTOLAMI et al., 2019, UMEDA et al., 2019, HUANG et al., 2020, SHNAIDERMAN-TORBAN et al., 2020, CARVALHO et al., 2021). O mesmo perfil de isolados de EBSL- *E. coli* são relatados entre tutores e seus animais de companhia, mas não é possível indicar o sentido da transmissão (CARVALHO et al., 2016; DERAKHSHANDEH et al., 2018; ABBAS et al. 2019; TOOMBS-RUANE et al. 2020). As fezes provenientes, desse trabalho, vieram de animais domiciliados e que estavam fazendo o coproparasitológico por vários motivos, inclusive monitoramento de parasitos de rotina, em nenhuma dessas amostras o veterinário pediu coprocultura,

não sendo, portanto, uma enterite bacteriana um diagnóstico diferencial. O tempo de domiciliação não foi possível ser estabelecido, pois em alguns casos as amostras foram provenientes de animais mantidos em lares temporários, como os isolados 1,2 e 3 proveniente de um cão resgatado. CALIXTO et al. (2021b) relataram o aumento da prevalência do encontro de *E. coli* com espectro estendido para as cefalosporinas em cães tratados com terceira geração de cefalosporina em tratamentos para cinomose e parvovirose, podendo ser recuperadas em até 8 semanas após a finalização do tratamento.

O encontro de 4 isolados de *E.coli* resistente ao ertapenem associado a resistência para outras classes de antibióticos (Quadro 6) nos remete a algumas questões, pois as drogas pertencentes aos carbapenems são as de escolha para seres humanos quando estão infectados com bactérias multi resistentes ou que possuem o perfil de betalactamase estendida (PAPP-WALLACE et al., 2011). Mello (2014), no Distrito Federal, isolou uma *E. coli* resistente ao ertapenem através de swab de arrasto numa clínica veterinária, já PUÑO-SARMIENTO (2013) detectaram *E. coli* multiresistentes, incluindo o imipenem e sugeriram que poderia ser advindo de seres humanos. Enterobactérias resistentes aos carbamatos foram descritas em animais de produção, de companhia e de vida livre (KÖCK et al., 2018) e SELLERA et al. (2021) apresentam uma revisão sobre patógenos produzindo carbapenemase e referem alguns mecanismos de aquisição dessas bactérias, como o contato direto com o hospedeiro colonizado ou através do ambiente hospitalar veterinário contaminado.

Mesmo com uma amostragem limitada proveniente de amostras de coproparasitológico, abordagem apenas fenotípica da sensibilidade aos antimicrobianos e restrita dos fatores de virulência, nesse trabalho pode ser observado a presença de isolados com perfil de betalactamase espectro estendida, isolados multirresistentes, e presença de resistência a ertapenem, antibiótico pouco utilizado na clínica de pequenos animais. Esses encontros podem ter implicações não somente na conduta clínica futura desses animais, mas de saúde humana e ambiental, devido a manutenção dessas colônias e a possibilidade de transmissão interespecie. Um outro aspecto que deve ser lembrado é que alguns animais são de resgate e dificilmente, quando em lares temporários, são mantidos em quarentena, podendo, eventualmente, colonizar os demais membros de família multiespecie.

8 CONCLUSÃO

Foi possível detectar isolados de *E. coli* dos patótipos STEC e EHEC com diferentes perfis fenotípicos de resistência e de filogrupos distintos. O encontro de isolados multirresistentes, com perfil de betalactamase estendida e isolados multirresistentes, inclusive ao ertapenem em amostras enviadas para diagnóstico coparasitológico servem de alerta para uma melhor condução no uso de antibióticos e um lembrete aos técnicos e veterinários que fazem o coparasitológico que mantenham as medidas de biossegurança e de higiene pessoal.

9 REFERÊNCIAS

ABBAS G, KHAN I, MOHSIN M, SAJJAD-UR-RAHMAN, YOUNAS T, ALI S. High rates of CTX-M group-1 extended-spectrum β -lactamases producing *Escherichia coli* from pets and their owners in Faisalabad, Pakistan. **Infect Drug Resist.** 2019 Mar 6; v. 12, p. 571-578. doi: 10.2147/IDR.S189884. PMID: 30881062.

ALMEIDA, P. M. ARAIS, L. R. ANDRADE, J. R. C. PRADO, E. H. R. B, IRINO, K. CERQUEIRA, A. D. (2012) Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) isolated from dogs. **Veterinary Microbiology** 158: 420–424, 2012.

ARAIS, L. R. et al. Zoonotic potential of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) isolated from puppies with diarrhoea in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 227, n. December, p. 45–51, 2018.

BÉLANGER, L. et al. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 1–10, 2011.

BENTANCOR A., M.V. RUMI, M.V. GENTILINI, C. SARDOY, K. IRINO, A. AGOSTINI, A. CATALDI. 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.**, 267 (2007), pp. 251-256

BLANCO, M., BLANCO J. E., BLANCO J., ALONSO, M.P., BALSALOBRE C., MORININO, M., MADRID C., JUAREZ A. et al. Polymerase chain reaction for detection *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, p. 95–101, 1996

BORTOLAMI A, ZENDRI F, MACIUCA EI, WATTRET A, ELLIS C, SCHMIDT V, PINCHBECK G, TIMOFTE D. Diversity, Virulence, and Clinical Significance of Extended-Spectrum β -Lactamase- and pAmpC-Producing *Escherichia coli* from Companion Animals. **Front Microbiol.** Jun 5, v.10, p. 1260 2019. Disponível em: doi: 10.3389/fmicb.2019.01260.

BOURNE JA, CHONG WL, Gordon DM. 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.** Mar 4; v. 14, n.3, p. e0212867, 2019. Disponível em: doi: 10.1371/journal.pone.0212867.

BOUZARI, S.; JAFARI, A.; ASLANI, M. M. *Escherichia coli*: A brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 102–117, 2012.

BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING - BrCast. Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica. 2018.

CARVALHO AC, BARBOSA AV, ARAIS LR, RIBEIRO PF, CARNEIRO VC, CERQUEIRA AM. Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of *Escherichia coli* from dogs and owners. **Braz J Microbiol**. Jan-Mar; v. 47, n. 1, p. 150-8, 2016. Disponível em: doi: 10.1016/j.bjm.2015.11.005.

CARVALHO I, CUNHA R, MARTINS C, MARTÍNEZ-ÁLVAREZ S, SAFIA CHENOUF N, PIMENTA P, PEREIRA AR, RAMOS S, SADI M, MARTINS Â, FAÇANHA J, RABBI F, CAPITA R, ALONSO-CALLEJA C, DE LURDES NUNES ENES DAPKEVICIUS M, IGREJAS G, TORRES C, POETA P. Antimicrobial Resistance Genes and Diversity of Clones among Faecal ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Healthy and Sick Dogs Living in Portugal. **Antibiotics** (Basel). Aug 20, v. 10, n. 8:10132021. Disponível em doi: 10.3390/antibiotics10081013.

CASAGRANDE, M. F. Quantificação de Enterobactérias e *Clostridium* spp. e detecção molecular de *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em pontos da cadeia produtiva de carne de frango. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Campus Jaboticabal, p. 75, 2016.

Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). *Escherichia coli*: General Information. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>. Acessado em 28 de Julho de 2021.

CLERMONT O., CHRISTENSON, JK, DENAMUR E., GORDON, DM. 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. Disponível em: doi:10.1111/1758-2229.12019

CLERMONT, O. et al. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 3107–3117, 2019.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–4558, 2000.

COSTA, M. M. da et al. *Escherichia Coli* Pathotypes in Swine Production and Their Environmental and Antimicrobial Drug Resistance Implications. **Arq. Inst. Biol.**, v. 76, n. 3, p. 509–516, 2009.

COURA, F. M., LAGE, A. P., HEINEMANN, M. B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 811-18, 2014.

DANIEL DE PAULA, C. M.; CASARIN, L. S.; TONDO, E. C. *Escherichia coli* O157:H7- patógeno alimentar emergente. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 2, n. 4, p. 23–33, 2014.

DE OLIVEIRA SOUZA, C. et al. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreiogênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 7, p. 1–2, 2016.

DEBROY, C.; MADDOX, C. W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance . **Animal Health Research Reviews**, v. 2, n. 2, p. 129–140, 2001.

DERAKHSHANDEH A, ERAGHI V, BOROOJENI AM, NIAKI MA, ZARE S, NAZIRI Z. Virulence factors, antibiotic resistance genes and genetic relatedness of commensal *Escherichia coli* isolates from dogs and their owners. **Microb Pathog**. Mar; v. 116, p. 241-245, 2018. Disponível em: doi: 10.1016/j.micpath.2018.01.041.

DUPONT, S. et al. Enteropathogens in pups from pet shops and breeding facilities. **Journal of Small Animal Practice**, v. 54, n. 9, p. 475–480, 2013.

FACCO, C. Presença de *Escherichia coli* em infecções do trato urinário e seu perfil de resistência aos antimicrobianos. Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA, p. 1–41, 2015.

FAÚLA, L. L. Fatores de virulência, sorotipos e susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *escherichia coli* isoladas de alimentos no estado de Minas Gerais, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 2016.

FERNANDES, M. R. et al. International high-risk clonal lineages of CTX-M-producing *Escherichia coli* F-ST648 in free-roaming cats, South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 66, n. May, p. 48–51, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.09.009>>.

FRANCK, S. M.; BOSWORTH, B. T.; MOON, H. W. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1795–7, 1998.

FRANCO, A. Infecção Do Trato Urinário Por *Escherichia coli* Em Cães E Gatos: Mecanismos Moleculares De Resistência Aos Antibióticos B-Lactâmicos. v. 2010, p. 17–18, 2017.

GAYNES, R. The Discovery of Penicillin-New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. **Emerg. Infect. Dis.** 23, 849–853, 2017.

GOFFAUX, F. et al. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. **Research in Microbiology**, v. 151, n. 10, p. 865–871, 2000.

GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3–30, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>>.

GRINBERG, A. BIGGS, P. J. ZHANG, J. RITCHIE, S. ONEROA, Z. O'NEIL, C. KARKABA, A. VELATHANTHIRI, N. S. COOMBS, G. W. Genomic epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* across colonisation and skin and soft tissue infection. **J. Infect**, 2017.

GUO, S., WAKEHAM, D., BROUWERS, H. J., COBBOLD, R. N., ABRAHAM, S., MOLLINGER, J. L., JOHNSON, J. R., CHAPMAN, T. A., GORDON, D. M. & OTHER AUTHORS. Human-associated fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clonal lineages, including ST354, isolated from canine feces and extraintestinal infections in Australia. **Microbes Infect**, v. 17, p. 266–274, 2015.

HAMMERMUELLER, J. et al. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. **Canadian Journal of Veterinary Research**, p.265–270, 1995.

HUANG YH, KUAN NL, YEH KS. Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* From Dogs and Cats Admitted to a Veterinary Teaching Hospital in Taipei, Taiwan From 2014 to 2017. **Front Vet Sci**. Jul, v. 16, n. 7:3952020, 2020. Disponível em: doi: 10.3389/fvets.2020.00395

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: Past, Present and Future. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 51, p. 72–80, 2019.

ISHII J.B., FREITAS J.C. & ARIAS M.V.B. 2011. Resistência de bactérias isoladas de cães e gatos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (2008-2009). **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 31, n. 6, p. 533-537.

J. R. JOHNSON, K. OWENS, A. GAJEWSKI, C. CLABOTS. *Escherichia coli* colonization patterns among human household members and pets, with attention to acute urinary tract infection, **J. Infect. Dis.**, v. 197, p. 218–224, 2008.

JARLIER, V. et al. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns. **Clinical Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 867–878, 1988.

K. A. STENSKE, D. A. BEMIS, B. E. GILLESPIE, D. H. D'SOUZA, S. P. OLIVER, F. A. DRAUGHON, K. J. MATTESON, J. W. Bartges, Comparison of clonal relatedness and antimicrobial susceptibility of fecal *Escherichia coli* from healthy dogs and their owners, **Am. J. Vet. Res.**, v. 70, p. 1108–1116, 2009.

K. HARADA, E. OKADA, T. SHIMIZU, Y. KATAOKA, T. SAWADA, T. TAKAHASHI, Antimicrobial resistance, virulence profiles, and phylogenetic groups of fecal *Escherichia coli* isolates: a comparative analysis between dogs and their owners in Japan, **Comp Immunol Microbiol Infect**, v. 35, p. 139–144, 2012.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.

KARAHUTOVÁ, L.; MANDELÍK, R.; BUJ ŤNÁKOVÁ, D. Antibiotic Resistant and Biofilm-Associated *Escherichia coli* Isolates from Diarrheic and Healthy Dogs. **Microorganisms**, v. 9: 1334, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061334>

KARKABA, A. et al. Carriage and population genetics of extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in cats and dogs in New Zealand. **Veterinary Microbiology**, v. 233, n. January 2021, p. 61–67, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.015>>.

KIFLU, B. et al. Salmonella serotypes and their antimicrobial susceptibility in apparently healthy dogs in Addis Ababa, Ethiopia. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2017.

KIM, Y. Bin et al. Molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* from broiler chickens with colibacillosis. **Poultry Science**, v. 99, n. 2, p. 1088–1095, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.047>>.

KÖCK R, DANIELS-HAARDT I, BECKER K, MELLMANN A, FRIEDRICH AW, MEVIUS D, SCHWARZ S, JURKE A. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review. **Clin Microbiol Infect.** Dec; v. 24, n. 12, p. 1241-1250, 2018. Disponível em: doi: 10.1016/j.cmi.2018.04.004.

LANGONI, 2017. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1261– 1269., 2017.

LARA ROSA, J.; FERREIRA BARROS, R.; DE OLIVEIRA SANTOS, M. Características da *Escherichia coli* Enterohemorrágica (Ehec). **Saúde & Ciência Em Ação**, v. 2, n. 1, p. 66–78, 2016. Disponível em: <<https://revistas.unifan.edu.br/index.php/RevistaICS/article/view/191>>.

LAU, S. H., REDDY, S., CHEESBROUGH, J., BOLTON, F. J., WILLSHAW, G., CHEASTY, T., FOX, A. J. & UPTON, M. (2008). Major uropathogenic *Escherichia coli* strain isolated in the northwest of England identified by multilocus sequence typing. **J Clin Microbiol** 46, 1076–1080

LIM, J. Y.; YOON, J. W.; HOVDE, C. J. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2010.

MAGIORAKOS A-P, SRINIVASAN A, CAREY RB, CARMELI Y, FALAGAS M E, GISKE C G, HARBARTH S, HINDLER J F, KAHLMETER G, OLSSON-LILJEQUIST 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 **Clin Microbiol Infect.**, v. 18, n. 3, p. 268-81, 2012. Disponível em: doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

MARIANI, TM. Fatores de risco para excreção fecal e perfil de sensibilidade de *E. coli* isoladas de cães hospitalizados na região de Dourados-MS. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Universidade do Oeste Paulista, SP, 2013.

MARKS SL, RANKIN SC, BYRNE BA, WEESE JS. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. **J Vet Intern Med** v. 25, p. 1195–1208, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00821.x>

MEGID J., RIBEIRO M. G., PAES A. C. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

MOL, N. et al. Avian pathogenic *Escherichia coli* infection of a chicken lung epithelial cell line. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 210, n. November 2018, p. 55–59, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.03.007>>.

MORATO, E. P. et al. Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, n. 5, p. 229–237, 2009.

MOURA, R. A. et al. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7399–7408, 2009.

MURPHY, C. P. et al. *Escherichia coli* and selected veterinary and zoonotic pathogens isolated from environmental sites in companion animal veterinary hospitals in southern Ontario. **Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 9, p. 963–972, 2010.

OSUGUI L, DE CASTRO AF, IOVINE R, IRINO K, CARVALHO VM. Virulence genotypes, antibiotic resistance and the phylogenetic background of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections of dogs and cats in Brazil. **Vet Microbiol.**, v. 25, n. 171, p. 1-2):242-7, 2014. Disponível em: doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.027.

PAPP-WALLACE KM, ENDIMIANI A, TARACILA MA et al. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, p. 4943–60, 2011

PUÑO-SARMIENTO, J. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 3–4, p. 676–680, 2013.

PUVAČA, N.; FRUTOS, R. de L. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from humans and pet animals. **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2021.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, 2014.

SALGADO-CAXITO M, BENAVIDES JA, ADELL AD, PAES AC, MORENO-SWITT AI. Global prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -

lactamase producing-*Escherichia coli* in dogs and cats - A scoping review and meta-analysis. **One Health**. Mar v. 20, n. 12:100236, 2021. Disponível em: doi: 10.1016/j.onehlt.2021.100236.

SALGADO-CAXITO M, MORENO-SWITT AI, PAES AC, SHIVA C, MUNITA JM, RIVAS L, BENAVIDES JA. Higher Prevalence of Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant Enterobacterales in Dogs Attended for Enteric Viruses in Brazil Before and After Treatment with Cephalosporins. **Antibiotics** (Basel). Jan 28, v. 10, n. 2, p. 122, 2021. Disponível em: doi: 10.3390/antibiotics10020122.

SELLERA FP, DA SILVA LCBA, LINCOPAN N. Rapid spread of critical priority carbapenemase-producing pathogens in companion animals: a One Health challenge for a post-pandemic world. **J Antimicrob Chemother**. Aug 12, v.76, n. 9, p.2225-2229, 2021. Disponível em: doi: 10.1093/jac/dkab169. PMID: 34109407.

SELLERA, F. P. et al. Identification of KPC-2-producing *Escherichia coli* in a companion animal: a new challenge for veterinary clinicians. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2259–2261, 2018.

SHNAIDERMAN-TORBAN A, NAVON-VENEZIA S, KELMER E, COHEN A, PAITAN Y, ARIELLY H, STEINMAN A. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacterales Shedding by Dogs and Cats Hospitalized in an Emergency and Critical Care Department of a Veterinary Teaching Hospital. **Antibiotics** (Basel). Aug 27, v. 9, n. 9, p. 545. 2020. Disponível em: doi: 10.3390/antibiotics9090545.

SIQUEIRA, A. K. RIBEIRO, M. G. LEITE, D. S. TIBA, M. R. MOURA C. D. LOPES, M. D. PRESTES, N. C. SALERNO, T. SILVA, A. V. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. **Res Vet Sci**. Apr; 86 (2): 206-10, 2009.

SOUTO, J. P. et al. Poluição Fecal Da Água: Microorganismos Indicadores. VI Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, v. 1, n. 6, p. 1–6, 2015.

SOUZA MELLO, MANUELLA RODRIGUES de. Detecção da atividade da enzima carbapenemase em Enterobacteriaceae e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em clínicas veterinárias do Distrito Federal, Brasil. Programa em Saúde Animal, UnB, 2014.

TAKAGI, H. et al. Pathotypes and drug susceptibility of *Escherichia coli* isolated from companion dogs in Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 73, n. 3, p. 253–255, 2020.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 207–217, 2010.

THUNGRAT, K. et al. Antimicrobial susceptibility patterns of clinical *Escherichia coli* isolates from dogs and cats in the United States: January 2008 through January 2013. **Veterinary Microbiology**, v. 179, n. 3–4, p. 287–295, 2015.

TOKUDA, K., NISHI J., IMUTA N., FUJIYAMA R., KAMENOSONO A., MANAGO K., KAWANO Y. et al. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: Biofilm formation and acid resistance. **Microbiology and Immunology**, v. 54, n. 6, p. 320–329, 2010

TOOMBS-RUANE, L. J. et al. 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. 1–15, 2020.

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.

UMEDA K, HASE A, MATSUO M, HORIMOTO T, OGASAWARA J. Prevalence and genetic characterization of cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae among dogs and cats in an animal shelter. **J Med Microbiol.** Mar; v. 68, n. 3, p. 339-345. 2019. Disponível em: doi: 10.1099/jmm.0.000933. Epub 2019 Jan 30.

VALAT C, DRAPEAU A, BEURLET S, BACHY V, BOULOUIS H-J, PIN R, CAZEAU G, MADEC J-Y AND HAENNI M (2020) Pathogenic *Escherichia coli* in Dogs Reveals the Predominance of ST372 and the Human-Associated ST73 Extra-Intestinal Lineages. **Front. Microbiol.**, v. 11, p. 580. Disponível em: doi:10.3389/fmicb.2020.00580

VANGCHHIA B, ABRAHAM S, BELL JM, COLLIGNON P, GIBSON JS, INGRAM PR, JOHNSON JR, KENNEDY K, TROTT DJ, TURNIDGE JD, GORDON DM. Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of phylogroup F *Escherichia coli* in Australia. **Microbiology**, v. 162, n. 11, p. 1904-1912, 2016 Disponível em: doi: 10.1099/mic.0.000367

VEGA-MANRIQUEZ, X. D. et al. Pet dogs potential transmitters of pathogenic *Escherichia coli* with resistance to antimicrobials. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 5, p. 1173–1179, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00203-020-01828-9>>.

VILA, J. et al. *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 4, p. 437–463, 2016.

WALTHER, B.; TEDIN, K.; LÜBKE-BECKER, A. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. **Veterinary Microbiology**, v. 200, p. 71–78, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.05.017>>.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Antimicrobial Resistance (AMR). 2015. Disponível em: <http://www.oie.int/for-the-media/amr/>. Acesso em 02 de Agosto de 2021.

YURI, K. et al. Serotypes and Virulence Factors of *Escherichia coli* Strains Isolated from Dogs and Cats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, n. 1, p. 37–40, 1999.

ZACHARY, J. F. MCGAVIN M. D. Bases da patologia veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro, 2013.