

Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de fêmeas suínas com infecção urinária

José Arthur de Souza Barbosa, Beatriz Martins Parra

Andrea Micke Moreno

FMVZ - USP

Jarthurbarbosa@usp.br

Objetivos

Infecções do trato urinário (ITUs) são altamente prevalentes na suinocultura, acometendo majoritariamente fêmeas e trazendo prejuízos por conta do aumento das falhas reprodutivas, aumento das taxas de descarte e redução do número de leitões desmamados/porca/ano. O agente etiológico que é isolado com maior frequência nos casos de ITUs em matrizes suínas é a *Escherichia coli*, bactéria da família *Enterobacteriaceae*. Por sua ampla distribuição e facilidade de obter plasmídeos carregando genes de resistência, estas bactérias são umas das principais espécies que vem desenvolvendo maior resistência aos antimicrobianos na atualidade. A obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM) é uma técnica eficiente para a determinação da resistência de cepas bacterianas frente aos antibióticos, além de produzir resultados quantitativos que servem de base para o cálculo de doses e tratamentos mais eficientes. O propósito deste estudo foi montar um painel de antimicrobianos para avaliar a resistência de cepas de *E. coli* isoladas de fêmeas suínas com cistite ou pielonefrite.

Métodos e Procedimentos

O total de 94 fêmeas oriundas de um rebanho de 18000 matrizes, localizado no Centro-Oeste brasileiro, foram necropsiadas, com amostras de urina e suabes da pelve renal sendo coletadas e transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Sanidade Suína da FMVZ/USP. As amostras foram semeadas em ágar MacConkey, Chromagar Orientation® e ágar Brucella com 5% sangue de carneiro e incubadas. Colônias com morfologia sugestiva

para *Escherichia coli* foram selecionadas e estocadas em caldo BHI, com glicerol (30%) a -86°C. Para a realização deste estudo 120 estirpes foram retiradas do freezer e semeadas em ágar MacConkey novamente. Colônias com morfologia sugestiva foram semeadas em caldo BHI, onde alíquotas foram retiradas para extração protéica e posteriormente sua identificação confirmada pela técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF. O perfil de resistência foi determinado pelo teste de microdiluição em caldo, conforme os padrões definidos no documento CLSI VET08. Após a diluição das amostras e a inoculação nos poços as placas foram seladas com filme adesivo e incubadas a 37°C por 24 horas. A CIM foi definida como a menor concentração onde visualmente não havia crescimento bacteriano. Foi utilizada como controle interno a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Após a obtenção dos valores de CIM para cada amostra foram determinadas a CIM50 e CIM90, conforme metodologia descrita por Schwarz et al. (2010).

Resultados

Dentre as estirpes de *Escherichia coli* isoladas dos animais necropsiados testadas para determinação da CIM observou-se altas taxas de multirresistência (90,98%) e as classes com maior taxa de resistência foram quinolonas, tetraciclina, beta-lactâmicos e macrolídeos. Os valores obtidos frente a cada antimicrobiano, assim como a frequência de resistência e a CIM50 e CIM90 podem ser visualizadas na tabela 1.

Tabela 1: Número de estirpes apresentando diferentes valores de CIM, valores de CIM50 e CIM90, e frequência de resistência.

Antimicrobianos	Número de cepas													CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128			
Ampicilina	0	0	0	0	3	19	10	0	2	2	1	83	0	>64	>64	71,7
Amoxicilina/clavulanato (2:1)*	0	0	0	0	0	1	17	18	22	43	16	3	0	32	64	51,7
Ceftiofur	0	0	89	26	3	0	0	0	2	0	0	0	0	≤0,25	0,5	1,7
Cefalexina	0	0	0	0	0	2	30	71	10	4	3	0	0	8	16	5,8
Enrofloxacin	0	0	18	8	13	11	6	64	0	0	0	0	0	>4	>4	85,0
Ciprofloxacina	0	0	0	0	11	6	11	92	0	0	0	0	0	>4	>4	100,0
Marbofloxacina	5	6	8	13	14	8	14	52	0	0	0	0	0	4	>4	55,0
Espectinomicina	0	0	0	0	0	0	0	61	27	12	7	10	3	≤8	128	10,8
Florfenicol	0	0	0	2	5	6	13	27	67	0	0	0	0	>8	>8	55,8
Gentamicina	0	0	0	78	14	2	2	5	7	12	0	0	0	≤0,5	16	15,8
Neomicina	0	0	0	0	0	0	110	2	8	0	0	0	0	≤4	≤4	8,3
Oxitetraciclina	0	0	0	0	0	19	1	0	0	2	98	0	0	>32	>32	83,3
Azitromicina	0	0	0	0	0	0	43	19	7	8	8	35	0	8	>64	64,2
Estreptomicina	0	0	0	0	0	9	17	4	6	84	0	0	0	>16	>16	70,0
Fosfomicina	0	0	0	0	0	0	0	113	4	3	0	0	0	≤8	≤8	0,0
Colistina	0	0	0	0	65	51	1	0	0	3	0	0	0	≤1	2	3,3

*Considerando o valor da amoxicilina

CIM (µg/ml)	≤128	256	512	>512	CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
Sulfadimetoxina	45	51	20	4	256,00	512,00	20%
CIM (µg/ml)	≤1/19	2/38	4/76	>4/76	CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
Sulfa+trimetoprim	92	0	0	28	≤1/9	>4/76	23%

Conclusões

Os achados deste estudo indicam a elevada presença *E. coli* do patotipo UPEC isoladas de matrizes suínas, apresentando perfil de multirresistência a antimicrobianos. O fato de que alguns dos antimicrobianos considerados de maior prioridade pela OMS, como a ciprofloxacina, apresentarem altos níveis de resistência é um importante alerta. Apesar dos resultados alarmantes, é um achado positivo o fato de haver poucas estirpes resistentes à colistina e à fosfomicina, que são antimicrobianos de grande importância no controle de infecções nosocomiais em humanos.

Referências Bibliográficas

BACH, Marcio José et al. Uso racional de antimicrobianos para tratamento de infecção urinária em porcas. Cienc.Anim.Bras., v. 22, 2021.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 4th ed. CLSI supplement VET08. CLSI; 2018.

COSTA, M. M. et al. Patotipos de *Escherichia coli* na suinocultura e suas implicações ambientais e na resistência aos antimicrobianos. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 76, n. 3, p. 509-516, 2009.

DROLET R. 2012. Urinary system. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, eds. Diseases of swine. 10th ed.p. 363–379.

SCHWARZ, Stefan et al. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. J. Antim. Chemother., v. 65, n. 4, p. 601-604, 2010.

VENANCIO, L. F. B. et al. Microbiological aspects of *Escherichia coli* in urinary tract infections in sows of commercial farms in Sinop-MT. Sci. Electron. Arch, v. 10, n. 6, p. 109-115, 2017.

Evaluation of antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli* isolated from swine females with urinary tract infection

José Arthur de Souza Barbosa, Beatriz Martins Parra

Andrea Micke Moreno

School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo

jarthurbarbosa@usp.br

Objectives

Urinary tract infections (UTIs) are highly common diseases in pig farming, affecting mostly females and causing economic losses due to increased reproductive failures, raised discard rates and reduction in the number of piglets produced per gestation. The most frequent etiological agent isolated in UTIs cases in sows is *Escherichia coli*, bacteria from the *Enterobacteriaceae* family. Due to its wide distribution and ability to acquire plasmids carrying resistance genes, these bacteria are one of the species that are developing higher antimicrobial resistance nowadays. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) is an efficient technique to determine antimicrobial resistance rates of bacterial strains, in addition to the production of quantitative data that can be used as bases to dose calculations and more efficient treatments. The main goal of this study was to assemble a list of antimicrobials to determine resistance rates of *Escherichia coli* strains isolated from sows with cystitis and pyelonephritis.

Materials and Methods

94 swine females from a 18000 sows herd, located in Brazilian Midwest, were necropsied, with samples of urine and swabs from renal pelvis being collected and sent under refrigeration to Laboratório de Sanidade Suína da FMVZ/USP. The samples were plated in MacConkey, Chromagar Orientation® and Brucella agar with 5% sheep's blood, and then incubated. Colonies showing suggestive *Escherichia coli* shapes were selected and stored in BHI broth medium, with glycerol (30%) under -86°C.

For the realization of this research were taken out from the freezer and plated again in MacConkey agar. Colonies with suggestive morphology were sown in BHI broth, then aliquots were collected for protein extraction and further identification through MALDI-TOF. 200 microplates were prepared, containing commonly used antibiotics in swine husbandry, with good antimicrobial activity against gram-negative agents in the urinary tract. The resistance profiles were determined by the microdilution method in broth medium, according to the CLSI VET08 standards. After the sample's dilution and inoculation in the plate wells, they were incubated under 37°C for 24 hours. The MIC were defined as the smaller concentration where visually bacterial growth happened. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 strain was used in internal control. After the MIC values were obtained, MIC50 and MIC90 were determined as described by Schwarz et al. (2010).

Results

Among the *E. coli* strains isolated from necropsied animals tested for MIC determination, high multiresistance rates were observed (90,98%) and the antimicrobial classes which the bacteria showed less susceptibility were quinolones, tetracyclines, B-lactams and macrolides. The obtained values for each antimicrobial, resistance rates, MIC50 and MIC90 can be checked in table 1.

Antimicrobials	Number of strains													CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128			
Ampicillin	0	0	0	0	3	19	10	0	2	2	1	83	0	>64	>64	71.7
Amoxicillin/clavulanate (2:1)*	0	0	0	0	0	1	17	18	22	43	16	3	0	32	64	51.7
Ceftiofur	0	0	89	26	3	0	0	0	2	0	0	0	0	≤0.25	0.5	1.7
Cefalexin	0	0	0	0	0	2	30	71	10	4	3	0	0	8	16	5.8
Enrofloxacin	0	0	18	8	13	11	6	64	0	0	0	0	0	>4	>4	85.0
Ciprofloxacin	0	0	0	0	11	6	11	92	0	0	0	0	0	>4	>4	100.0
Marbofloxacin	5	6	8	13	14	8	14	52	0	0	0	0	0	4	>4	55.0
Spectinomycin	0	0	0	0	0	0	0	61	27	12	7	10	3	≤8	128	10.8
Florfenicol	0	0	0	2	5	6	13	27	67	0	0	0	0	>8	>8	55.8
Gentamicin	0	0	0	78	14	2	2	5	7	12	0	0	0	≤0.5	16	15.8
Neomycin	0	0	0	0	0	0	110	2	8	0	0	0	0	≤4	≤4	8.3
Oxytetracycline	0	0	0	0	0	19	1	0	0	2	98	0	0	>32	>32	83.3
Azithromycin	0	0	0	0	0	0	43	19	7	8	8	35	0	8	>64	64.2
Streptomycin	0	0	0	0	0	9	17	4	6	84	0	0	0	>16	>16	70.0
Fosfomycin	0	0	0	0	0	0	0	113	4	3	0	0	0	≤8	≤8	0.0
Colistin	0	0	0	0	65	51	1	0	0	3	0	0	0	≤1	2	3.3

CIM (µg/ml)	≤128	256	512	>512	CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
Sulfadimidine	45	51	20	4	256.00	512.00	20%
CIM (µg/ml)	≤1/19	2/38	4/76	>4/76	CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
Sulfathiazole/trimethoprim	92	0	0	28	≤1/9	>4/76	23%

Table 1- Number of strains for each MIC value, resistance rates, MIC50 and MIC90

Conclusion

This Study's findings indicate a high presence of UPEC pathotype of *E. coli* isolated in swine females showing multidrug resistance profile. The fact that some of the antimicrobials considered of High Priority by WHO, as Ciprofloxacin, were ineffective against most of the strains is a big warning. Despite the alarming results, it is positive finding the low resistance rates to Colistin and Fosfomycin, which are important antimicrobials in the control of human infections.

References

- BACH, Marcio José et al. Uso racional de antimicrobianos para tratamento de infecção urinária em porcas. *Ciência Animal Brasileira*, v. 22, 2021.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 4th ed. CLSI supplement VET08. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- COSTA, M. M. et al. Patotipos de *Escherichia coli* na suinocultura e suas implicações ambientais e na resistência aos antimicrobianos. *Arquivos do Instituto*

Biológico, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 509-516, 2009.

DROLET R. 2012. Urinary system. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. *Diseases of swine*. 10th ed. Ames (IA): John Wiley & Sons; p. 363–379.

SCHWARZ, Stefan et al. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 65, n. 4, p. 601-604, 2010.

VENANCIO, L. F. B. et al. Microbiological aspects of *Escherichia coli* in urinary tract infections in sows of commercial farms in Sinop-MT. *Scientific Electronic Archives*, v. 10, n. 6, p. 109-115, 2017.