



BACTÉRIAS ESKAPE EM AMBIENTES VETERINÁRIOS: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS COM ÊNFASE EM QUINOLONAS

Bruna Alves Ottobeli

Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-estar e Produção Animal
Sustentável na Fronteira Sul (UFS) e bolsista da CAPES

Letícia Trevisan Gressler

Professora doutora do Instituto Federal Farroupilha (IFFar)

Dalila Moter Benvegnú

Professora doutora da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFS)

1. Introdução

O crescente processo de resistência antimicrobiana tem ultrapassado os esforços internacionais para conter a emergência dos patógenos resistentes a antimicrobianos, o que atualmente resulta em 700 mil óbitos anuais e até 2050, poderá atingir 10 milhões, anualmente (WHO, 2019; Guenin *et al.*, 2022). A aquisição de genes de resistência por patógenos ESKAPE – representados por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. – merece atenção pelo perfil multirresistente da maior parte dos isolados, sendo importantes impulsionadores das taxas de mortalidade (Santajit; Indrawattana, 2016; De Oliveira *et al.*, 2020).

Dentre as classes e subclasses de antimicrobianos, as quinolonas são consideradas de importância crítica para a medicina e medicina veterinária (WHO, 2019). No entanto, relatos de resistência contra essa classe têm atingido níveis alarmantes mundialmente (Karshenas *et al.*, 2022). Nesse sentido, a perspectiva de Saúde Única destaca a importância do monitoramento dos padrões de resistência de bactérias patogênicas como mecanismo para entender e gerenciar a ameaça representada à saúde (Djordjevic *et al.*, 2024). Portanto, o objetivo do presente projeto é isolar bactérias do grupo ESKAPE de ambientes veterinários e identificar os padrões de resistência a quinolonas expressos por esses patógenos, apontando para a relevância do nicho ambiental como um importante reservatório de bactérias portadoras de genes de resistência relevantes para a saúde



humana e animal.

2. Metodologia

Serão incluídas superfícies, equipamentos, instrumentos de manejo e outros materiais considerados limpos utilizados no manejo animal, totalizando 200 colheitas. As colheitas serão realizadas com auxílio de *swabs* estéreis, que serão friccionados em movimentos de vaivém com leve pressão, em superfícies em área delimitada de 5 x 5 cm².

Os *swabs* serão inoculados em Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubados em aerobiose a 35°C ± 1°C por 24 horas. Em seguida, serão semeados em Ágar Sangue - 5% de sangue ovino e ágar MacConkey e incubadas em aerobiose a 35°C ± 1°C por até 72 horas, visando a obtenção de bactérias do grupo ESKAPE.

Os isolados serão caracterizados fenotipicamente por suas características morfo-tintoriais e bioquímicas (Quinn, 2005). Para confirmação da identificação, serão submetidos à Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF). Os testes posteriores serão realizados a partir da padronização do inóculo, em que as bactérias serão inoculadas em 4 mL de NaCl 0,9% estéril até atingir o valor 0,5 na escala de McFarland, e sua turbidez será confirmada por espectrofotometria a 600 nanômetros até atingir o valor 0,08 a 0,13° Ângstrom, que corresponde a 1x10⁸ UFC/mL (CLSI, 2015).

Para a técnica de disco-difusão, os inóculos padronizados serão semeados em Ágar *Mueller-Hinton* (MH) e serão acrescidos discos de quinolonas, incluindo ácido nalidíxico - 30 µg, enrofloxacin 30 µg, ciprofloxacina - 30 µg, norfloxacina - 30 µg, levofloxacina - 30 µg e moxifloxacina - 30 µg. As placas serão incubadas em aerobiose a 35°C ± 1°C por 18 horas. Os halos formados serão medidos e comparados com os estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017; CLSI, 2018).

Para a concentração inibitória mínima (CIM), serão adicionados 180 µL de Caldo *Muller-Hinton* (MHB) estéril em cada poço da fileira “A” de uma microplaca de 96 poços, e os poços da fileira “B” à fileira “G” receberão 100 µL. 20 µL dos antimicrobianos serão distribuídos nas fileiras “A” até “G”, e a última será reservada para os controles negativo (apenas MHB) e positivo (MHB e cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213). Diluições serão realizadas transferindo 100 µL de uma fileira para a próxima, resultando em sete concentrações. 10 µL do inóculo padronizado serão adicionados e a placa será incubada em aerobiose a 35°C ± 1°C por 24 horas. A CIM será determinada pela leitura da



densidade óptica a 605 nanômetros (CLSI, 2017; CLSI, 2018).

Na mesma placa, serão adicionados 15 µL de Resazurina a 0,01%, com uma hora de incubação em aerobiose a 35°C ±1°C. A redução de resazurina, sugestiva de metabolismo celular, será designada pela mudança da coloração azul para a rosa. A reação redutiva será confirmada por espectrofotometria a 590 nanômetros (Kumar; Nagarajan; Uchil, 2018). Para a concentração bactericida mínima (CBM), 10 µL das substâncias serão semeadas em ágar MH e serão incubadas em aerobiose a 35°C ±1°C por 24h e será considerada a CBM a menor diluição em que não houver crescimento (CLSI, 1999).

Para a pesquisa de biofilme, as bactérias serão inoculadas em microplacas e incubadas em aerobiose a 37°C por 24 horas. Para o controle positivo, será utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, e para o negativo, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Após a incubação, o conteúdo será vertido, serão adicionados 200 µl de solução de NaCl 0,9% e será vertido novamente. Após a secagem, serão adicionados 200 µL de metanol por 15 minutos. O metanol será vertido e o conteúdo será corado com 200 µL de cristal violeta por mais 15 minutos. O conteúdo será vertido e os poços serão lavados com água. Ao final, serão adicionados 240 µL de ácido acético glacial e as placas serão submetidas a leitura da densidade óptica a 600 nanômetros (Stepanovi *et al.*, 2007).

Para a pesquisa de bombas de efluxo, as bactérias serão cultivadas em Ágar MH e incubadas em aerobiose a 35°C ±1°C por 24 horas. Uma colônia será transferida para TSB e mantida durante mais 24 horas (Gressler *et al.*, 2014). O inóculo será aplicado em placas de MH com 0,2 mg/mL de brometo de etídio e incubado em aerobiose a 35°C ±1°C por 48 horas. As placas serão visualizadas em luz ultravioleta, sendo considerado positivo para o sistema de efluxo a fluorescência das colônias. Como controle positivo, será utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gressler *et al.*, 2014).

Para a Reação em Cadeira da Polimerase (PCR), as bactérias serão inoculadas em MH e incubadas em aerobiose a 37°C por 24 horas. Três a cinco colônias serão suspensas em 500 µL de água Milli-Q e submetidas a extração de DNA por aquecimento. O protocolo de PCR será realizado de acordo com o procedimento padronizado para cada kit comercial, considerando as seis bactérias-alvo. Ao final, 5 µL do produto obtido será corrido em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV. Os produtos amplificados serão enviados para



sequeenciamento na plataforma Sanger para detecção de mutações nos genes *GyrA* e *ParC*.

A análise será feita no GraphPad Prism®. Serão calculadas medidas de tendência central (média e mediana) e dispersão (desvio padrão). A normalidade dos dados será avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. CIM e CBM serão analisadas por ANOVA. A expressão de bombas de efluxo, formação de biofilme e presença de genes de resistência serão avaliadas por prevalência. O nível de significância adotado será $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

Em ensaios preliminares com 25 coletas, quatro das bactérias-alvo foram isoladas de um hospital veterinário, *Staphylococcus aureus* (5 == 20%), *Enterococcus faecium* (2 == 8%), *Klebsiella pneumoniae* (1 == 4%) e *Pseudomonas aeruginosa* (1 == 4%). Fora desse grupo, o principal isolado foi *Staphylococcus* coagulase negativa. O predomínio de *Staphylococcus* spp. é sustentado pela literatura, tratando-se de um patógeno amplamente disseminado em superfícies, pele e mucosas (Tigabu; Getaneh, 2021).

O baixo percentual de coliformes e agentes saprófitos, representado por *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, indica eficiência na limpeza dos ambientes amostrados, embora ainda seja identificada certa persistência. Até o presente momento, dentro do que se sabe, há apenas um estudo em nível mundial que correlacione esse grupo de patógenos com ambientes veterinários, o que representa um importante limitante para o entendimento da dinâmica populacional bacteriana em um contexto de saúde única.

4. Considerações finais

Espera-se que os resultados deste estudo permitam a identificação de isolados ESKAPE em ambientes veterinários, com destaque para a frequência e o perfil de resistência a quinolonas. Desse modo, contribuirá para o mapeamento da diversidade microbiana nesses ambientes, bem como para a compreensão do papel da microbiota ambiental como reservatório de patógenos multirresistentes na perspectiva “One Health”.

Referências

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline.** CLSI document M26-A. Wayne, PA: NCCLS, 1999. ISBN 1-56238-384-1.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard.** 10th ed. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: CLSI, 2015.



CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals**. 4. ed. CLSI supplement VET08. Wayne, PA: CLSI, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**. 4th ed. CLSI supplement VET08. Wayne, PA: CLSI, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: CLSI, 2017.

DE OLIVEIRA, D. M. P. *et al.* Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, p. 10.1128/cmr.00181-19, 2020. DOI: 10.1128/CMR.00181-19.

DJORDJEVIC, S. P. *et al.* Genomic surveillance for antimicrobial resistance - a One Health perspective. **Nature Reviews Genetics**, v. 25, n. 2, p. 142-157, 2024. DOI: 10.1038/s41576-023-00649-y.

GRESSLER, L. T. *et al.* Genotypic and phenotypic detection of efflux pump in *Rhodococcus equi*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 661-665, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200040>.

GUENIN, M. J. *et al.* A participatory approach for building ex ante impact pathways towards a prudent use of antimicrobials in pig and poultry sectors in France. **PLoS One**, v. 17, n. 11, p. e0277487, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0277487.

KARSHENAS, A. E. *et al.* Prevalence of main quinolones and carbapenems resistance genes in clinical and veterinary *Escherichia coli* strains. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 841, 2022. DOI: 10.18502/ijm.v14i6.11259.

KUMAR, P. *et al.* Analysis of cell viability by the alamarBlue assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6. DOI: 10.1101/pdb.prot095489.

QUINN, P. J. *et al.* Diagnóstico laboratorial de doenças bacterianas. In: QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 5, p. 37-42.

SANTAJIT, S. *et al.* Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed Research International**, v. 2016, n. 1, p. 2475067, 2016. DOI: 10.1155/2016/2475067.

STEPANOVIC, S. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm.630.x>.

TIGABU, A.; GETANEH, A. L. E. M. *Staphylococcus aureus*, ESKAPE Bacteria Challenging Current Health Care and Community Settings: a Literature Review. **Clinical Laboratory**, n. 7, 2021. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2020.200930.



WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance**. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) Critically Important Antimicrobials for Human Medicine**. 6th Revision. 2019.

Agradecimentos

O presente projeto está sendo desenvolvido com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.