ANNA CATHARINA MAIA DEL GUERCIO VON SYDOW

**Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em
estirpes de *Escherichia coli* em fezes de cães errantes**

São Paulo

2005

ANNA CATHARINA MAIA DEL GUERCIO VON SYDOW

**Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em
estirpes de *Escherichia coli* em fezes de cães errantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

SÃO PAULO

2005

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Conf. ficha, resumo
e total de páginas 8f
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ARICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
29/6/05

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1547 FMVZ	<p>Von Sydow, Anna Catharina Maia Del Guercio</p> <p>Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em estirpes de <i>Escherichia coli</i> em fezes de cães errantes / Anna Catharina Maia Del Guercio Von Sydow. – São Paulo : A. C. M. G. Von Sydow, 2005.</p> <p>88 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2005.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.</p> <p>Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.</p> <p>1. <i>Escherichia coli</i>. 2. Fezes. 3. Cães. 4. Antibióticos [resistência]. 5. Fatores de virulência. I. Título.</p>
----------------	---

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Ocorrência de *Escherichia coli* em fezes de cães errantes na Cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo", Protocolo nº 172/2002, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sendo aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Ocurrence of *Escherichia coli* in faeces of stray dogs in Guarulhos city, São Paulo" protocol number 172/2002, under the responsibility of Prof.Dr. Nilson Roberti Benites, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commision of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting.)

São Paulo, 27 de junho de 2002

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

VON SYDOW, A. C. M. D. G.: Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* em fezes de cães errantes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Dirce e Francisco (*in memoriam*) que sempre me incentivaram a trilhar o caminho do conhecimento e do respeito ao próximo.

Aos meus filhos Bruno e Mariana que compreenderam o quanto é importante a dedicação ao estudo para que, com ele, possam construir um mundo mais justo.

Ao meu marido Max que me ofereceu sua ajuda, com carinho, em todos os momentos, fossem eles bons ou ruins.

A minha irmã Anna Paula, ao meu cunhado Alfredo, à minha sogra Ingeborg que me ajudaram, cada um com seu jeito e capacidade profissional, a realizar partes importantes deste trabalho.

Aos meus amigos e parentes que me apoiaram e me incentivaram a ir em frente, nas minhas horas de estudo.

Aos animais e à natureza, que com sua infinita beleza inspiram-me a lutar por sua continuidade.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Nilson Roberti Benites pelo apoio, por sua dedicação ao ensino, pela sua sensatez e, principalmente pela sua amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Doenças Infecciosas e Fungos do VPS, Dra. Priscilla, Jennifer, Mônica, Mirian, Luis Ivan, Clarisse, Sônia, Andrezza, Felício e estagiários que tanto me ajudaram nos trabalhos práticos, no interesse em dividirmos nossas dúvidas e aprendizagem.

Aos mestres Veterinários Daniel Aspis, Mirian Lippolis e Ana Marina Lino pela sua imensa boa vontade e ajuda na coleta das amostras.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Suína Profa. Dra. Andrea M. Moreno, Renata, Daniela, estagiários, funcionários pela dedicação e paciência em nos ajudar e ensinar as técnicas de PCR.

Aos Profs. Drs. Silvio e Fumio, professores do VPS, e todos àqueles que acreditaram, apoiaram e incentivaram de uma maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho.

À Fapesp à Capes pelo auxílio financeiro à nossa pesquisa.

RESUMO

VON SYDOW, A. C. M. D. G.: **Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* em fezes de cães errantes. [Evaluation of the occurrence of virulence factors in *Escherichia coli* in faeces of wandering dogs]**. 2005. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

O presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar os microrganismos aeróbicos e a frequência de isolamento de *Escherichia coli* patogênica ao homem em fezes de cães sem sintomas de colibacilose e assim averiguar a participação do cão como fonte de infecção de colibacilose humana. No período de setembro de 2002 a outubro de 2004, foram coletadas 220 amostras de fezes de animais capturados pelos CCZ de Guarulhos, Cotia e Barueri, cidades do Estado de São Paulo. O método de coleta foi através de *swabs* estéreis profundamente ao intestino dos animais anestesiados, mantidos sob refrigeração e em caldo BHI. As bactérias foram isoladas por semeadura em Mac Conkey, ágar sangue e Sabouraud. Houve crescimento de microrganismos em 100% delas. Foram isolados os seguintes microrganismos: 120 (54,54%) estirpes de *E. coli* em cultura pura e 76 (34,54%) estirpes em associação com outros agentes, *Proteus mirabilis* (2,27%), *Klebsiella pneumoniae* (2,27%), dentre outros microrganismos. Deve-se ressaltar ainda o isolamento de leveduras (*Candida albicans*) em associação com outros agentes a partir de 05 (2,27%) amostras de *swabs* retais. Uma vez isoladas, seus genes de virulência foram detectados por PCR. De um total de 196 estirpes de *E. coli* isoladas, 123 (62,75%) apresentaram um ou mais dos fatores de virulência estudados. Dessas 196 estirpes, 16 (8,16%) foram positivas para *afa*, 54 (27,55%) foram positivas para *sfa*, 38 (19,38%) foram positivas para *pap*, 66 (33,67%) foram positivas para *aer*, 31 (15,81%) foram positivas para *cnf*, 13 (6,63%) foram positivas para *hly*, 01 (0,51%) foi positiva para VT2 e nenhuma das linhagens foi positiva para LT, STa e STb. Os

cães aparentemente saudáveis, sem sintomas de colibacilose, poderiam estar participando da cadeia epidemiológica como reservatórios de *E. coli* uropatogênica ao homem, pois os genes encontrados com maior número foram *aer*, *sfa* e *pap* presentes em infecções extraintestinais, mais especificamente infecções urinárias. Os cães podem participar como reservatório de estirpes de *E. coli* resistentes a antimicrobianos. Das amostras de *E. coli* testadas, 85,64% apresentaram resistência à Cefalotina e 0% de resistência à Norfloxacin. Há a necessidade de mais pesquisas sobre o modo de transmissão das *E. coli* patogênicas entre o cão e o homem e dos fatores de virulência uropatogênicos encontrados com maior frequência tais como *aer*, *sfa* e *pap*.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Fezes. Cães. Antibióticos [resistência]. Fatores de virulência.

ABSTRACT

VON SYDOW, A. C. M. D. G.: **Evaluation of the occurrence of virulence factors in *Escherichia coli* in faeces of wandering dogs.** [Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* em fezes de cães errantes]. 2005. 88 f. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The objective of the present study was to isolate and identify aerobic microorganisms and the isolation frequency of *E. coli* pathogenic to man in faeces of dogs without colibacillosis symptoms and thus to verify the participation of dog as a source of human colibacillosis infection. In the period between September 2002 to October 2004, 220 samples of faeces were collected from animals captured by the CCZ of Guarulhos, Cotia and Barueri, cities in the São Paulo state. The collection method used was barren swabs deeply to the intestine of anesthetized animals, which were kept under refrigeration and in a BHI broth. The bacteria were isolated through sowing in Mac Conkey, agar blood and Sabouraud. In 100% of them there was microorganism growth. The following microorganisms were isolated: 120 (54.54%) *E. coli* lineages in pure culture and 76 (34.54% lineages in association with other agents, *Proteus mirabilis* (2.27%), *Klebsiella pneumoniae* (2.27%), amongst other microorganisms. The isolation of yeasts (*Candida Albicans*) in association with other agents from 05 (2.27%) rectal samples swabs must be emphasized. Once isolated virulence genes were detected by PCR. Of a total of 196 isolated lineages of *E.coli*, 123 (62.75%) presented one or more of the studied virulence factors. Of these 196 lineages, 16 (8.16%) were positive for *afa*, 54 (27.55%) positive for *sfa*, 38 (19.38%) positive for *pap*, 66 (33.67%) positive for *aer*, 31 (15.81%) positive for *caf*, 13 (6.63%) positive for *hly*, 01 (0.51%) positive for VT2 and none of the lineages were positive for *LT*, *Stx* and *STx*. Apparently healthy dogs, without colibacillosis

symptoms could be participating in the epidemiological chain as an *E. coli* reservoir uropathogenic to man, as the genes found with high frequency were *aer*, *sfa* and *pap* present in extraintestinal infections, more specifically urinary infections. The dogs can participate as a reservoir of *E. coli* lineages resistant to antimicrobials. Of the *E. coli* samples tested, 85,64% presented resistance to Cefalotina and 0% resistance to Norfloxacin. More research is needed on how the transmission of pathogenic *E. coli* between the dog and man happens and also on the uropathogenic virulence factors found more frequently, such as *aer*, *sfa* and *pap*.

Key words: *Escherichia coli*. Faeces. Dogs. Antibiotics [resistance]. Virulence factors.

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1 - “Primers” utilizados na PCR para amplificar fragmentos de diferentes genes para enterotoxinas (LT, STa e STb) e vô- rocitotoxinas (VT1, VT2 e VT2c) e de diferentes genes para pap, sfa, afa, hly, era e cnf1.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Quantidade de isolados, por gênero ou espécie, de bactérias e fungos obtidas a partir dos exames microbiológicos realizados com 220 swabs retais de cães.....	67
Tabela 2 -	Frequência de resistência e sensibilidade de estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de fezes normais de cães aparentemente saudáveis frente a diversos antimicrobianos.....	71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Distribuição de frequência de fatores de virulência encontrados nas linhagens de <i>E. coli</i> isoladas de amostras de fezes de cães.....	69
Gráfico 2 -	Distribuição, em porcentagem, da sensibilidade e resistência a antibióticos de estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de fezes de cães sem sinais de diarreia.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NM	Não móvel
Sfa	Adesina fimbrial S
ExPEC	<i>E. coli</i> extraintestinal
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
LPS	Lipopolissacarídeo
CFA	Fator de colonização antigênico
KDA	Kilo Dalton
LA	Lesão Localizada
DEPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica do cão
FV	Fator de virulência
mM	Milimolar
μM	Micromolar
U	Unidade
μL	Microlitro
bp	Pares de bases
gr	Grama
mL	Mililitro
M	Molar
pH	Potencial de hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
EDTA	Ácido dietilenodiaminotetracético
μg	Micrograma
NCCLS	“National Committee for Clinical Standart”

Obs: Algumas abreviaturas seguem as iniciais de sua grafia no idioma Inglês, visto o uso consagrado na literatura técnica.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	20
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1	CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DA <i>E. coli</i>	21
3.2	MÉTODOS DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO.....	23
3.3	OCORRÊNCIA NATURAL E PATOGÊNICA NO HOMEM E NOS ANIMAIS.....	25
3.4	CLASSIFICAÇÃO SOROLÓGICA.....	28
3.5	CLASSIFICAÇÃO DAS <i>E.coli</i>	30
3.5.1	<i>E. coli</i> Enteroinvasora (EIEC).....	31
3.5.2	<i>E. coli</i> Enterotoxigênica (ETEC).....	33
3.5.3	<i>E. coli</i> Enteropatogênica (EPEC).....	39
3.5.4	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica (EHEC).....	44
3.5.5	<i>E. coli</i> Uropatogênica (UPEC).....	48
3.5.6	<i>E. coli</i> Enteroagregativa (EaggEC).....	51
3.5.7	<i>E. coli</i> que Adere Difusamente (DAEC).....	52
3.6	OUTROS FATORES DE VIRULÊNCIA.....	53
3.6.1	Aerobactina.....	53
3.6.2	Hemolisina.....	55
3.6.3	Fator Necrotizante Citotóxico.....	55
3.6.4	Fator – R.....	57
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1	COLETA DE AMOSTRAS.....	59

4.2	EXAMES MICROBIOLÓGICOS DE AMOSTRAS DE FEZES DE CÃES.....	61
4.3	ESTUDO DA PRESENÇA DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM LINHAGENS DE <i>Escherichia coli</i> ISOLADAS DE FEZES DE CÃES SEM DIARRÉIA UTILIZANDO A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	61
4.3.1	Extração do DNA bacteriano	63
4.3.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	64
4.3.3	Deteção do produto amplificado	64
4.4	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	68
4.5	ESTATÍSTICA.	68
5	RESULTADOS	66
5.1	EXAMES MICROBIOLÓGICOS DE AMOSTRAS DE FEZES DE CÃES ERRANTES.....	66
5.2	ESTUDO DA PRESENÇA DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM LINHAGENS DE <i>Escherichia coli</i> ISOLADAS DE FEZES DE CÃES SEM DIARRÉIA UTILIZANDO A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	68
5.3	ESTUDO DA PRESENÇA DE RESISTÊNCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS EM ESTIRPES DE <i>E. coli</i> ISOLADAS DE FEZES DE CÃES SEM SINAIS DE DIARRÉIA.....	70
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

Escherichia coli é considerada habitante natural do trato intestinal dos animais e do homem, mas também aparece como uma importante causa de diarreias, infecções urinárias, mastites, septicemias, meningites, etc. Tem sido apontada como responsável por causar diarreia seguida de morte em crianças de países em desenvolvimento, assim como causa colite hemorrágica (HC), síndrome urêmica hemorrágica (HUS) seguidas de falência renal, em crianças e adultos em países desenvolvidos, sendo o sorotipo O157:H7 o mais comumente isolado de pacientes com HUS. Este sorotipo não foi diagnosticado no Brasil. Veículos de infecção têm sido alimentos de origem animal, água e alimentos mal lavados. No entanto, há relato da ocorrência de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC ou STEC) no Brasil, mas com o sorotipo O111:NM, em crianças com diarreia aguda sanguinolenta e não sanguinolenta atendidas em emergência em Hospital da cidade de São Paulo, Brasil (CAMPOS; TRABULSI, 1999; GUTH, 2002; SUSSMAN, 1997; WANG, 2002; YATSUYANAGI, 2002).

As diferentes formas de manifestação clínica das colibaciloses estão associadas a diferentes propriedades de virulência do microrganismo. Os fatores de virulência de *Escherichia coli* podem ser componentes da estrutura bacteriana, produção de diferentes tipos de exotoxinas (enterotoxinas, verotoxinas, fator necrotizante citotóxico, hemolisinas, entre outros), bem como capacidade de resistência aos antimicrobianos. Com relação às infecções intestinais, pelo menos seis categorias de *Escherichia coli* são conhecidas: *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteropatogênica

(EPEC), *Escherichia coli* entero-hemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EaggEC), *Escherichia coli* que adere difusamente (DAEC) (CAMPOS; TRABULSI, 1999; RIBEIRO, 2001).

Além da ocorrência de colibaciloses em suínos, bovinos e aves, existem relatos em cães e gatos, embora em número mais reduzido. Muitos pesquisadores admitem a participação de cães filhotes ou adultos sem manifestação de sintomas de colibacilose, na cadeia epidemiológica como reservatório de *Escherichia coli* patogênica ao homem (DROLET et al., 1994).

E. coli enteropatogênicas foram isoladas de cães filhotes saudáveis em um canil, nos Estados Unidos, onde houve um surto de diarreia sanguinolenta (HOLLAND et al., 1999). Estudo feito por Nakazato et al. (2004) confirma a presença de *E.coli* enteropatogênica em cães brasileiros com ou sem diarreia. Os fatores de virulência achados nestas linhagens foram similares às EPEC em humanos, levando a possibilidade de a EPEC poder se mover entre populações humanas e caninas.

O grupo das *Escherichia coli* uropatogênicas (UPEC) está associado a doenças no trato urinário tanto em humanos como em animais. Grande parte das infecções de trato urinário tem início com a colonização do colón por uma estirpe de *E.coli* que tem a capacidade de causar infecções naquele sítio. As infecções de trato urinário em humanos, geralmente são causadas por linhagens uropatogênicas de *E.coli*, as quais possuem capacidade de adesão à mucosa da vesícula urinária, sendo que as adesinas mais importantes nestas situações são os *pili* (os genes que os codificam são designados *pap* - *pili* associado com pielonefrite). Além dos *pili*, existem as fímbrias S (*sfa*), que também se constituem em importantes adesinas no sítio mencionado (SAYLERS; WHITT, 1994). *E.coli* uropatogênicas podem apresentar a habilidade de adquirir ferro, o que também constitui importante fator de

virulência, sendo que um dos mecanismos utilizados é o sideróforo, codificado pelo gene *aer* (SAYLERS; WHITT, 1994).

Fatores de virulência uropatogênicos foram detectados em fezes de cães saudáveis, sendo *pap* o gene encontrado com maior frequência (YURI et al., 1997, 1998). *Escherichia coli* de fezes de cão, comumente exibem características típicas de ExPEC humana (*E. coli* extraintestinal). A maioria dos isolados de fezes de cão são *pap* positivo e podem ser diretamente relacionados com isolados clínicos de pacientes humanos com cistite, pielonefrite, bacteremia ou meningite. Quando *E. coli pap* positiva estava presente, era predominante nas estirpes de *E. coli* fecal (JOHNSON et al., 2000).

O cão errante poderia estar contaminando o meio ambiente e expondo o ser humano a enterites por *E. coli* e até mesmo outras manifestações de colibacilose, através do risco de contaminação de mananciais ou pelo contato direto que pessoas poderiam vir a ter com estes animais os quais, desta forma, atuariam como fontes de infecção na ocorrência de colibacilose humana (BLANCO et al., 1997; KRUTH, 1998; MURRAY, 1999).

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

- Verificar a ocorrência de *Escherichia coli* patogênica ao homem nas fezes de cães errantes, aparentemente saudáveis, isto é, com ausência de sintomas de colibacilose.
- Verificar a frequência de microrganismos presentes na microbiota intestinal dos cães errantes estudados.
- Pesquisar a presença de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas das fezes dos cães de rua, utilizando a técnica de PCR (“Polimerase Chain Reaction” ou reação em cadeia da polimerase).
- Traçar um perfil de sensibilidade a agentes microbianos das estirpes de *Escherichia coli* isoladas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Por mais de meio século, a *E. coli* foi considerada o principal comensal em fezes. Essa visão mudou progressivamente ao longo dos anos com o acúmulo de evidências indicando que *E. coli* é capaz de causar doenças no homem e nos animais. Infecções devido a *E. coli* patogênica podem ser limitadas à colonização da superfície da mucosa ou podem ser disseminadas pelo corpo e tem sido associada à infecções do trato urinário, septicemia, meningites e infecção gastro intestinais (CHEN; FRANKEL, 2005).

3.1 Características microbiológicas da *Escherichia coli*

Escherichia coli está compreendida dentro do Gênero *Escherichia*, Família *Enterobacteriaceae*. Trata-se de um bastonete Gram negativo, que pode estar isolado ou aos pares, medindo aproximadamente 1,5 x 4 micrômetros, representa uma importante parte das bactérias anaeróbias facultativas (DROLET et al.,1994). Em meio sólido, não são pigmentadas e podem ser lisas ou rugosas, geralmente as colônias são circulares, com bordos bem definidos quando lisas. Algumas estirpes produzem colônias mucóides. Cresce muito bem à temperatura de 37°C (SUSMANN, 1997).

Em ágar MacConkey, é ativa bioquimicamente; fermenta a glicose e outros açúcares, freqüentemente produz gás; são catalase positiva e oxidase negativa; reduz nitrato para nitrito (MURRAY, 1999).

Considerada habitante natural do segmento posterior do trato intestinal (extremo de íleo, cólon) dos animais de sangue quente e do homem e representa aproximadamente 1% da flora bacteriana do intestino (CAMPOS; TRABULSI, 1999; NICOLET, 1985). É eliminada com as fezes e contamina o meio ambiente. A presença desta espécie na água ou em alimentos é considerada ser indicador de contaminação fecal e, provavelmente não ocorre em vida livre no meio ambiente (MURRAY, 1999).

A função principal da *E. coli* reside na regularização dos processos intestinais de decomposição e a produção de importantes vitaminas (tiamina, ácido fólico, vitaminas C e K) (NICOLET, 1985).

A habilidade da *E. coli* de causar doença em humanos é devida à expansão de vários fatores de virulência, e os genes responsáveis por sua codificação podem estar localizados tanto no cromossomo como em plasmídios ou fagos. No cromossomo, os determinantes de virulência estão organizados em grandes fragmentos de DNA, denominados ilhas de patogenicidade (PAI) (DONNENBERG, 2001; KNÖBL, 2005). Sua patogenicidade vai ser caracterizada pela forma como a bactéria se liga à célula do hospedeiro, à produção de toxinas e a sua invasão. Uma bactéria patogênica é identificada através de seus fatores de virulência que vêm a ser “estratégias”, que de alguma maneira, contribuem para sua instalação no tecido humano ou animal de forma a vencer as barreiras de defesa do sistema imune. Entre os fatores de virulência que provocam a destruição tecidual incluem-se as exotoxinas, enzimas hidrolíticas, produtos bacterianos que induzem resposta auto-imune e endotoxinas (MURRAY, 1999; SEARS; KAPER, 1996).

A maioria das linhagens é móvel por possuírem flagelos peritricos típicos das Enterobacteriáceas. Também há as linhagens imóveis. Algumas formam cápsulas de

polissacarídeo. A estrutura celular de muitas se caracteriza pela posição das fímbrias e dos pili sexuais, assim como de plasmídios em seu citoplasma dos quais são responsáveis por muitas atividades biológicas como adesão, fermentação de açúcares, produção de colina, hemolisina, enterotoxina, resistência aos antibióticos, metais pesados e luz ultravioleta (NICOLET, 1985).

3.2 Métodos de Isolamento e Identificação

Tendo em vista que *E. coli* é componente normal da microbiota do intestino delgado e intestino grosso, o seu simples isolamento nas fezes ou intestino de cães e gatos não é significativo. Para se estabelecer a enteropatogenicidade de isolado de *E. coli*, devem ser realizados ensaios especializados tais como bioensaios, ensaios em cultura tecidual, imunoenaios, testes genômicos para diferenciar isolados invasivos ou enterogênicos de linhagens não patogênicas (ETTINGER, 1995).

Para o isolamento de *E. coli* pode-se utilizar ágar sangue e métodos seletivos que, por exemplo, inibam o crescimento de bactérias Gram positivas (Ágar –lactose azul de bromotimol, agar Endo, ágar MacConkey). O emprego de ágar- sangue permite a observação de produção de hemolisina (NICOLET,1985). As amostras fecais (fezes totais, “swabs” retais ou “swabs” preparados de fezes totais) devem ser examinadas assim que forem recebidas no laboratório. Se as amostras não puderem ser processadas imediatamente, devem ser refrigeradas a – 70°C logo depois da coleta. Se os “swabs” retais não puderem ser examinados dentro de 1 ou 2 horas, precisam ser colocados em meio de transporte e refrigerados. Devem ser

completamente cobertos pelo meio de transporte e mantidos suficientemente úmidos para seu ótimo restabelecimento (MURRAY, 1999).

Depois do advento da biologia molecular e a identificação de fatores de virulência, a superfície bacteriana recoberta por antígenos passou a ser tida como a impressão digital da bactéria, o que levou a uma classificação sorológica baseada nos diferentes antígenos da superfície molecular bacteriana (SAYLERS; WHITT, 1994).

Atualmente, o diagnóstico pode ser feito através de ELISA, sondas genéticas ou PCR que pesquisam os fatores de virulência da bactéria (CAMPOS; TRABULSI, 1999). Considerando a importância clínica das *E. coli* patogênicas métodos de detecção rápida, sensível e específica são requeridos para identificar isolados produtores de toxinas e substituir técnicas de cultura de tecidos que consomem muito tempo e são muito caras como as relatadas para *E. coli* enterotoxigênicas (POLLARD, 1990). Estudo feito por Yamamoto et al. (1995), revela a importância do uso de PCR na detecção de fatores de virulência para *E. coli* uropatogênicas (patogênicas para o sistema urinário). Tal detecção foi altamente específica, sensível e rápida e teve completa concordância com resultados obtidos por teste de hibridização com DNA. Segundo pesquisa de Woodward et al. (1992), PCR é um teste poderoso não apenas para detecção de seqüências específicas, mas também é importante na diferenciação entre seqüências similares.

3.3 Ocorrência natural e patogênica no homem e nos animais

A colonização do intestino tem lugar pouco depois do nascimento. A microbiota normal do intestino delgado tem um importante papel na colonização preventiva por bactérias patogênicas (GREENE, 1984; NICOLET, 1985).

Nos filhotes de cães, microrganismos que colonizam o trato intestinal são derivados da exposição com as mães, entre os filhotes da ninhada, com o meio ambiente; a primeira a colonizar é a *Escherichia coli* seguida de *Clostridium perfringens* e streptococos e, finalmente por *Lactobacillus* e *Candida*. *Escherichia coli*, como outras bactérias da microbiota intestinal, permanece relativamente estável na composição por toda a vida do indivíduo (GREENE, 1984). Estudos mostraram que bebês humanos tenderam a adquirir a microbiota fecal de suas mães, geralmente através da rota oral. A microbiota fecal dos bebês mostrou-se não ser tão diversa quanto à de suas mães e variação genética foi observada em linhagens durante a transmissão (SUSSMAN, 1997).

A concentração de bactérias no conteúdo do intestino delgado proximal é relativamente baixa, devido à influência do suco gástrico e da bile e, gradualmente aumentando para o máximo de sua concentração na região ileocecal. O duodeno e porção alta do jejuno abrigam a maioria das bactérias Gram positivas. Anaeróbios e bactérias gram negativas predominam na porção distal do intestino delgado e cólon (GREENE, 1984).

Algumas linhagens são consideradas patogênicas para o homem e/ou animais. Neste sentido, tem uma influência decisiva o estado de imunidade (infecções freqüentes em indivíduos jovens) e as mudanças das condições

fisiológicas determinantes das modificações da microbiota intestinal (por exemplo, depois do desmame ou perda de peso) (NICOLET, 1985).

Nos animais, a *E. coli*, tem aparecido como uma das causas mais importantes de várias manifestações clínicas como diarreia, mastite, endometrite, cistite, nefrite, artrite, aborto, osteomielite, endocardite, pneumonia, conjuntivite, septicemia, etc. (KRUTH, 1998) (RADOSTITIS¹ et al., 2000 apud RIBEIRO, 2001, p.). Cães e gatos pertencem àquelas espécies de animais que têm vivido muito próximas ao homem. Como consequência, contatos entre humanos, cães e gatos são numerosos e a possibilidade de transmissão de microrganismos entre estas espécies diferentes de hospedeiros é extremamente alta. Algumas *E. coli* patogênicas são transmitidas entre diferentes espécies de hospedeiros e pode causar doença em um e não em outro (BEUTIN, 1999)

Certas estirpes de *E. coli* comportam-se como patógenos em cães e gatos causando infecções gastrointestinais e doenças extraintestinais. *Escherichia coli* pode causar infecções no trato genito urinário e doenças sistêmicas em cães e gatos, tais como vaginites e piometra, prostatites, otite externa, bacteremia, endotoxemia, infecções respiratórias, cistites, osteomielites e fístula perianal (OLUOCH, 2004; BEUTIN, 1999). Linhagens de *E. coli* canina e felina pertencem a um número limitado de sorotipos e grupos clonais e são freqüentemente encontrados como parte da microbiota intestinal normal destes animais. Alguns dos tipos freqüentemente isolados de *E. coli* patogênica extraintestinal de cães, gatos e humanos parecem ter uma proximidade genética importante, mas apresentaram diferenças nas suas adesinas P-fimbriais que determinam a especificidade do

¹ RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIF, K. W. Diseases caused by *Escherichia coli*. In: **Veterinary Medicine**. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9 ed. London: W. B. Saunders, 2000, p. 779-809.

hospedeiro (BEUTIN, 1999). *Escherichia coli* é comumente isolada em piometra canina, mas pouco se conhece sobre os fatores de virulência que podem estar envolvidos na precipitação desta doença (CHEN, 2003). Wadas et al. (1996) trabalharam com cães saudáveis, com piometra e com infecções urinárias. Foram coletadas amostras de fezes normais de cães saudáveis (“swab” retal), amostras retais de pacientes com piometra (fezes normais), e urina de cães com infecção urinária. Os resultados indicam que os isolados mostraram um alto grau de similaridade entre as amostras. Estes achados sugerem que isolados de *E. coli* de piometra originam dos intestinos do mesmo cão.

Low et al. 1988 estudaram *E. coli* isoladas do reto e do trato urinário de cães com infecção urinária e concluíram que o isolado da urina poderia ser predominantemente de estirpe intestinal. Em mulheres, a microbiota fecal é reconhecida como reservatório de infecções bacterianas do trato urinário. A colonização do trato urinário de mulheres é freqüentemente precedida pela colonização do muco vaginal por bactérias da flora intestinal que ascendem pela uretra para a bexiga urinária. Isso pode levar a acreditar que isolados de *E. coli* de piometra canina podem, também ter origem fecal (WADAS, 1996).

No ser humano, o microrganismo tem sido associado a graves distúrbios intestinais, além de infecções urinárias, colite hemorrágica, meningites do recém nascido e septicemias. *E. coli* é responsável por aproximadamente 40 a 50% da casuística de septicemias, causadas por microrganismos Gram negativos no homem e 90% das infecções urinárias. (CAMPOS; TRABULSI, 1999).

3.4 Classificação sorológica

Certas estirpes de *E. coli* comportam-se como patógenos em cães e gatos causando infecções gastrointestinais e doenças extraintestinais. *Escherichia coli* pode causar infecções no trato genito urinário e doenças sistêmicas em cães e gatos, tais como vaginites e piometra, prostatites, otite externa, bacteremia, endotoxemia, infecções respiratórias, cistites, osteomielites e fístula perianal (OLUOCH, 2004; BEUTIN, 1999). Linhagens de *E. coli* canina e felina pertencem a um número limitado de sorotipos e grupos clonais e são freqüentemente encontrados como parte da microbiota intestinal normal destes animais. Alguns dos tipos freqüentemente isolados de *E.coli* patogênica extraintestinal de cães, gatos e humanos parecem ter uma proximidade genética importante, mas apresentaram diferenças nas suas adesinas P-fimbriais que determinam a especificidade do hospedeiro (BEUTIN, 1999). *Escherichia coli* é comumente isolada em piometra canina, mas pouco se conhece sobre os fatores de virulência que podem estar envolvidos na precipitação desta doença (CHEN, 2003).

Segundo Nicolet (1985), a tipificação sorológica baseia-se no reconhecimento dos antígenos:

- a) Antígenos O somáticos ou da parede celular (polissacarídeos, termoestáveis).
- b) Antígenos K da cápsula (polissacarídeos).
- c) Antígenos H dos flagelos (proteína termolábil).

Há também, os antígenos fimbriais, mas ainda não se tornou convencional incluí-los na fórmula sorológica (SUSSMAN, 1997). Fímbria e outras adesinas de superfície são fatores de virulência que têm sido usados com muito sucesso como antígenos para a sorotipagem. Devido à múltipla expressão fimbrial de alguns clones bacterianos são requeridos métodos mais sofisticados de identificação, os quais são feitos em laboratórios mais especializados (ORSKOV; ORSKOV, 1992).

Os antígenos O (somáticos), correspondem à fração polissacarídica do lipopolissacarídeo (LPS), componente comum da parede bacteriana das enterobactérias em geral, denominadas endotoxinas. O antígeno O identifica o sorogrupo da estirpe bacteriana (SAYLERS; WHITT, 1994). Nos processos infecciosos por *E. coli*, pode ocorrer liberação da fração LPS ou com a morte do organismo ou sua multiplicação. Há uma interação entre a fração LPS e as células epiteliais, principalmente leucócitos, provocando liberação de mediadores de inflamação. Tal processo pode determinar tanto a morte das bactérias quanto das células do hospedeiro, provocando destruição tecidual e sintomas sistêmicos (febre, distúrbios na circulação periférica e choque, como nas infecções mamárias) (RIBEIRO, 2001).

Raramente os antígenos O não estão associados a doenças. Muitos antígenos O, geralmente não associados com antígenos K, são aqueles encontrados em sorotipos de linhagens de certas doenças diarreicas, como as EPEC (ORSKOV; ORSKOV, 1992).

Os antígenos flagelares (H), de linhagens móveis, possuem função não totalmente esclarecida na patogenicidade do agente (ACRES, 1983). Muitas linhagens são vagarosamente móveis, isto é, é difícil sua produção em culturas para o propósito de determinação do antígeno (ORSKOV; ORSKOV, 1992).

A presença de antígeno K (capsular), de constituição polissacarídica e protéica que circunda a parede bacteriana, inibe a ativação do sistema complemento e /ou opsonização, auxiliando na proteção do agente etiológico contra mecanismos imunológicos entéricos de defesa. (RIBEIRO, 2001). Segundo Saylers e Whitt (1994), o antígeno H seria o identificador dos sorotipos da *E. coli*.

Nem todas as amostras de *Escherichia coli* provenientes, seja do intestino humano ou de qualquer outro local do organismo, apresentam os três tipos de antígenos ao mesmo tempo (CAMPOS; TRABULSI, 1999).

3.5 Classificação das *Escherichia coli*

Com relação às infecções intestinais, pelo menos seis categorias de *Escherichia coli* são conhecidas: *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* entero-hemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EaggEC), *Escherichia coli* que adere difusamente (DAEC).(CAMPOS; TRABULSI,1999; SAYLERS; WHITT, 1994).

3.5.1 *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)

São conhecidos 14 sorotipos (O28, O29, O112, O121, O124, O135, O143, O144, O152, O164, O167 e O173). (CAMPOS; TRABULSI, 1999; LEVINE, 1987). A maioria é imóvel e não possui o antígeno K e fermenta lactose em anaerobiose. Tais sorotipos são raramente encontrados em intestino normal ou associados com outras doenças por *E. coli* (ORSKOV; ORSKOV, 1992; SUSSMAN, 1997). A infecção causada por EIEC, consiste em inflamação e necrose da mucosa do cólon. Clinicamente, manifestam-se por diarreia sanguinolenta ou não, com presença de leucócitos e muco, geralmente acompanhada por dores abdominais e febre (CAMPOS e TRABULSI, 1999). A habilidade destas estirpes de invadir as células é devida a genes de virulência presentes no plasmídeo *pInv*.

Estudos demonstraram que filtrados de cultura de EIEC estimulam moderada secreção sem danos histológicos em segmento ileal ligado de coelho. A atividade secretória presente foi reportada ser, parcialmente termo lábil e ferro reguladora (SEARS; KAPER, 1996). EIEC apresenta a capacidade de invadir e se espalhar lateralmente para as células adjacentes da mucosa do cólon, onde proliferam, levando à morte celular. A capacidade de proliferar no interior das células e de provocar doença parece ser dependente de genes plasmidiais e cromossômicos. (CAMPOS; TRABULSI, 1999).

As EIEC não produzem a toxina Shiga, mas produzem, em baixos níveis, uma toxina semelhante (enterotoxina EIEC). As linhagens EIEC secretam uma pequena citotoxina (maior que 30kDa) com baixo nível de toxicidade em células Vero. Esta citotoxina é imunologicamente e geneticamente distinta das SLT I e SLT II e sua

atividade não é conhecida (SEARS; KAPER, 1996). Este fato explicaria a ausência de Síndrome Urêmica Hemolítica como complicação de disenteria devida a EIEC (SAYLERS; WHITT, 1994).

As infecções causadas por EIEC são mais freqüentes em crianças maiores de dois anos de idade e no adulto. O diagnóstico é feito pela coprocultura, que consiste no cultivo de EIEC em meios de MacConkey e SS (*Salmonella* e *Shigella*) e na caracterização de bio sorotipos (através de provas bioquímicas e sorológicas). Alguns sorotipos apresentam antígenos O idênticos aos da *Shigella*. Atualmente a identificação pode ser feita por meio de PCR (reação em cadeia da polimerase) ou de sondas genéticas que detectam uma sequência de plasmídio de invasão (CAMPOS; TRABULSI, 1999). Sua patogenicidade também pode ser demonstrada pelo teste de Serény, que consiste na instilação da bactéria no olho de cobaia albino. A amostra sendo invasora prolifera abundantemente nos tecidos do olho do animal, causando ceratoconjuntivite que cura espontaneamente em duas a três semanas.

As infecções por EIEC geralmente curam espontaneamente. Tais linhagens são sensíveis à maioria dos antibióticos. (CAMPOS; TRABULSI, 1999). No Brasil, atribui-se às infecções humanas a ingestão de água, alimentos contaminados e o contato pessoal. Não tem sido descrita em cães.

3.5.2 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

ETEC é uma das mais importantes causas de diarreia em humanos e animais domésticos. Infecções por ETEC comportam-se como um dos maiores problemas de saúde em países em desenvolvimento computando mais de 200.000 casos de diarreia e, aproximadamente 380.000 mortes anualmente entre crianças de menos de 5 anos de idade. Também são causa comum de diarreia entre viajantes de países industrializados menos do que em países em desenvolvimento (TAUSCHEK et al., 2002). Existem as amostras que produzem toxinas termolábeis (LT) e outras termoestáveis (ST). Algumas produzem as duas toxinas (CAMPOS; TRABULSI, 1999). As enterotoxinas produzidas pela ETEC foram primeiramente descritas em suínos e mais tarde em bezerros e cordeiros. Poucos sorotipos foram envolvidos, e em muitos destes foram encontrados grupos O como O138, O139 e O 141. Depois, O147, O149 e O157. As estirpes de ETEC, principalmente aquelas associadas com surtos, tendem a se agrupar em poucos sorotipos. (MURRAY, 1997; ORSKOV; ORSKOV, 1992).

Uma pesquisa feita no Japão com um surto de intoxicação alimentar, mostrou pessoas apresentando sintomas como diarreia, febre e dor abdominal. Foram examinadas amostras de fezes por PCR e constatou-se a presença de STh (toxina termo estável humana) (TSUJI et al., 2002). Linhagens de ETEC são importantes patógenos em São Paulo, Brasil, e são responsáveis por 7 a 20% dos casos de diarreia infantil. O reservatório da infecção por ETEC no homem é o próprio homem. A infecção se transmite pela ingestão de água ou alimentos contaminados. Há indícios da transmissão da bactéria por contato pessoal, em berçários e enfermarias

de pediatria (CAMPOS; TRABULSI, 1999). Os sintomas mais proeminentes da doença provocada por ETEC são diarreia com câibras abdominais acompanhada de náuseas e dor de cabeça, geralmente com poucos vômitos e febre. Embora a ETEC seja associada com suave diarreia aquosa, recentes surtos têm-se mostrado mais prolongados (MURRAY, 1999). As bactérias aderem superficialmente, não penetrando no epitélio intestinal. Devido a isso, as fezes não apresentam leucócitos, sangue ou muco (CAMPOS; TRABULSI, 1999).

ETEC coloniza o intestino delgado por meio de adesinas fimbriais e afimbriais, geralmente chamadas fatores de colonização antigênicos (CFA). São estruturas encontradas na superfície destas bactérias, geralmente de natureza fimbrial, que mediam a colonização intestinal. São proteínas imunogênicas sendo descritos vários tipos antigenicamente distintos (CFA/I, CFA/II, CFA/III, etc.). Mais recentemente foi descrita uma fímbria semiflexível, formadora de feixes, denominada *Longus*, que é codificada por plasmídio (*IngA*). Esta fímbria é homóloga à fímbria BFP de EPEC e pilinas tipo I de *Neisseria*, *Pseudomonas* e *Moraxella*. (CAMPOS; TRABULSI, 1999; PICHEL, 2002).

Diferentes estudos têm mostrado que os fatores de colonização (CFs) ocorrem em 43% de 29% das estirpes isoladas, mas um considerável número de linhagens de ETEC isoladas de pacientes com diarreia ainda não produzem CFs conhecidos (NISHIMURA et al., 2002).

Os principais CFAs associados às amostras de ETEC humana são CFA I e CFA II (SAYLERS e WHITT, 1994). Uma vez atada aos enterócitos, a bactéria produz a toxina termolábil ou “heat-labile” (LT) ou toxina termoestável ou “heat-stable” (ST), ou ambas causando a diarreia. Além disso, os fatores de virulência da

ETEC são freqüentemente associados com certos sorotipos O: H (PACHECO et al., 1997).

Investigações epidemiológicas mostram que estirpes de ETEC são geralmente restritas a um número limitado de sorotipos baseados na combinação de lipopolissacarídeos (LPS) (antígeno O) e flagelos (antígeno H) (PACHECO et al., 1997).

São conhecidas duas enterotoxinas LT (LT-I e LT-II); a LT-I é produzida por amostras associadas ao homem, enquanto a LT-II tem sido encontrada em amostras isoladas de alimentos e de certos animais, como os suínos (CAMPOS; TRABULSI, 1999).

A enterotoxina LT-I é uma proteína imunogênica de, aproximadamente 80 KDa (kilo - daltons) cuja seqüência de amoniácidos compartilha um grau de homologia com a toxina colérica (CT). Tais toxinas apresentam cinco subunidades B e uma subunidade A. A subunidade B da LT - I interage com o receptor celular como a toxina colérica (G M1) (CAMPOS; TRABULSI, 1999). Diferentemente da toxina colérica, que é excretada no meio de cultura, a LTI é introduzida no meio periplasmático pela bactéria (SAYLERS; WHITT, 1994). Durante a infecção intestinal a toxina sai da célula bacteriana para a mucosa intestinal, devido à presença de sais biliares e tripsina no suco entérico. Também pela baixa concentração de ferro (CAMPOS; TRABULSI, 1999; SAYLERS; WHITT, 1994). A toxina fixa-se ao receptor (G M1) através de sua subunidade B, ocorrendo a entrada da subunidade A na célula. Esta é clivada em A1 e A2 A subunidade A1 reage com o NAD (nicotinamida adenina dinucleotúdeo), ativando a adenilciclase que transforma ATP em AMP cíclico. Com o aumento do AMP cíclico e sua constante produção, acontece uma menor absorção de sódio pelas microvilosidades e maior excreção de cloro e

bicarbonato pelas criptas intestinais, com acúmulo de líquido na luz intestinal e diarreia. A subunidade A2 tem seu mecanismo, ainda desconhecido. A toxina LT II possui os mesmos mecanismos de ação e estrutura molecular que a LT I (CAMPOS e TRABULSI, 1999). A LT-II tem sido encontrada, primeiramente, em amostras de animais (suínos, bovinos e búfalos) e alimentos e não tem sido associada com doenças em outros animais e no homem (SAYLERS; WHITT, 1994; SUSSMAN, 1997). A LT II subdivide-se em LT IIa e LT IIb. A patogênese de tais toxinas não tem sido bem estabelecida. A LT IIa liga-se melhor ao receptor gangliosídeo GD1b e a LT IIb, adere-se melhor ao GD1a (SEARS; KAPERS, 1996). LT é estruturalmente e biologicamente relacionada à toxina colérica com 77% dos nucleotídeos e proteínas homólogas. Ambas são codificadas por plasmídios (TAUSCHEK, 2002).

As STa e STb são toxinas que apresentam tamanho menor (2 K Da), o que explica sua termoestabilidade (CAMPOS; TRABULSI,1999). Ambas são excretadas no meio de cultura, em uma série de etapas que vão modificando o tamanho da molécula. Processo semelhante é observado na secreção de STb. (CAMPOS; TRABULSI, 1999). A STa causa, com a fixação da bactéria na membrana celular, um aumento do GMP cíclico (através da ativação da guanilato ciclase) no citoplasma da célula do hospedeiro. Tal aumento determina alterações no metabolismo celular, inclusive com relação à atividade das bombas iônicas. O aumento do GMP cíclico leva às mesmas perdas de fluidos causadas pelo descontrole do AMP cíclico. (CAMPOS; TRABULSI, 1999; SAYLERS; WHITT, 1994). STb parece atuar por um mecanismo diferente de STa devido a uma seqüência diferente de aminoácidos. Tal toxina tem sido achada apenas em estirpes de ETEC de suínos, sendo questionável sua contribuição na doença intestinal humana. Em contraste, o papel da STa é bem estabelecida em doença humana (SAYLERS; WHITT, 1994).

Os genes das LT-I e STa são codificados em plasmídios denominados *ent* (SAYLERS; WHITT, 1994). As enterotoxinas humanas produzidas por estirpes de ETEC, são similares às amostras de animais, que também são determinadas por plasmídios. Os fatores de colonização ou de adesão, os quais, no entanto, são diferentes antigenicamente daquelas estirpes encontradas em porco e bezerro. A maioria dos surtos ocorridos nos EUA tem sido causada por amostras que produzem ST ou ST combinada com LT (MURRAY, 1999).

No Brasil, um estudo foi feito entre 1975 e 1989, mostrando a incidência de enterite patogênica por ETEC em crianças com idade entre 1 mês e 5 anos, com atendimento não hospitalizado, durante aproximadamente 12 meses. A proporção da diarreia foi de 7 a 12% , acontecendo mais freqüentemente entre Dezembro e Fevereiro (PACHECO et al., 1997).

A LT-I pode ser detectada em cultura de tecidos, aglutinação de hemácias, precipitação em gel, ELISA. A STa pode ser pesquisada por inoculação de camundongos recém nascidos com sobrenadantes das culturas (Teste de Dean). Um diagnóstico mais atual, é a pesquisa dos genes que codificam as toxinas LT-I e STa por meio de sondas genéticas ou de PCR.(CAMPOS e TRABULSI,1999).

ETEC podem apresentar resistência múltipla aos antimicrobianos com freqüência (CAMPOS e TRABULSI, 1999).

O papel da ETEC em doenças diarreicas em cães é bem pouco definido. No entanto, pesquisas têm documentado a ocorrência de ETEC em cães (HOLLAND, 1999). Geralmente, os surtos ocupam lugar durante a primavera e o verão e afeta cães de todas as idades, mas a incidência é maior nos adultos (STAATS, 2003). Holland et al. (1999), examinaram isolados de *E. coli* de uma população, selecionada ao acaso, de cães que, ocasionalmente teriam desenvolvido diarreia

sanguinolenta anteriormente, sem diagnóstico preciso. De 52 cães estudados, 22 apresentaram-se positivos para o gene *sta*, que codifica a toxina STa, pela técnica de PCR.

ETEC foram isoladas de cães com diarreia e caracterizadas por um número de métodos incluindo bioensaios, como alça ligada de íleo ou ensaio em camundongo recém nascido, por testes sorológicos, por métodos de detecção baseados em ácido nucleico. As ETEC isoladas de cães foram diferentes daquelas isoladas em humanos ou outros animais devido a alguns traços fenotípicos. Seus sorotipos foram raramente encontrados ou não encontrados entre isolados de humanos, suínos e bovinos. ETEC que produzem LT I não foram encontradas em cães (BEUTIN, 1999).

Olson et al. (1985) testaram amostras fecais de cães com diarreia e cães saudáveis para *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* para propriedades enterotoxigênicas. Vários testes foram realizados como estudo epidemiológico, ensaios com células CHO (célula de ovário de Hamster chinês), testes de hemaglutinação, sorológicos, microscopia eletrônica, testes para hemolisina. Foram encontradas toxinas LT produzidas por estirpes de *E. coli* em fezes de cães com diarreia. As amostras fecais de cães saudáveis do grupo controle não continham linhagens produtoras de toxina LT. Nenhuma das enterotoxinas foi neutralizada por anticorpos humanos anti-LT.

A maioria das estirpes de ETEC canina expressa enterotoxina ST, sendo as LT raramente encontradas. As *E. coli* enterotoxigênicas da cães freqüentemente produzem alfa hemolisina, da qual é encontrada em suínos, mas não em linhagens de ETEC humana. A verdadeira incidência deste patótipo em diarreia canina ainda é pouco esclarecida, com prevalência entre cães diarreicos entre 0 % a 31%,

particularmente em cães jovens e não foram encontradas em animais saudáveis do grupo controle (BEUTIN, 1999; MARKS, 2003).

3.5.3 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Os sorotipos EPEC da *E. coli* são conhecidos desde 1945. Desde então, a *Escherichia coli* foi implicada na ocorrência de diarreias e capaz de causar diarreias em crianças com menos de um ano de idade. Em São Paulo, Brasil, manifesta-se em 30% dos bebês, que geralmente não se alimentam com o leite materno (CAMPOS; TRABULSI, 1999).

A infecção localiza-se, preferencialmente, no intestino delgado. O reservatório das EPEC parece ser o próprio homem. Crianças com diarreia representam a principal fonte de infecção. (CAMPOS; TRABULSI, 1999). Tais bactérias pertencem a um grupo relativamente pequeno de sorogrupos O. Os primeiros identificados foram os sorogrupos O111:H2 (classificada como EPEC 1 é a *E. coli* mais comumente encontrada em crianças com diarreia nos EUA e o clone mais frequentemente encontrado associado com diarreia no Brasil), O55:H6 e subsequentemente foram adicionados muitos outros relacionados com surtos diarreicos (ORSKOV; ORSKOV, 1992). São conhecidos outros sorotipos tais como O18ab, O18ac, O44, O86:H34, O114:H2, O119:H6, O127:H6, O128:H2 e O142:H6 (CAMPOS; TRABULSI, 1999; DONNENBERG, 2001). Doenças diarreicas em animais causadas por *E. coli*, com especial característica de virulência como na EPEC humana, não têm sido descritas. Contudo a diarreia em coelhos causada por

E.coli, produz uma doença em coelhos que é similar a doença humana causada por EPEC em muitos aspectos (ORSKOV; ORSKOV, 1992). São causa de gastroenterite em bovinos jovens e neonatos (BEUTIN, 1999) e também tem sido associada com diarreia em uma larga fileira de espécies animais (MARKS, 2003).

A descrição de uma lesão localizada (LA), o plasmídio EAF responsável pela formação da lesão LA, localizado em uma ilha de patogenicidade referida como LEE ("locus of enterocyte effacement") e o teste de fluorescência da actina, têm servido de ferramentas para definir o grupo O da EPEC a que pertence às estirpes estudadas. O LEE é considerado ser uma ilha de patogenicidade porque contém um locus virulento, não encontrado em linhagens de *E. coli* não patogênicas, ele é inserido no genoma da *E. coli* em locais específicos (genes RNAt), e finalmente porque seu conteúdo distinto de G+C indica que é originária de outra espécie (DONNENBERG, 2001). Estudo feito em Bangkok, Tailândia, em crianças com diarreia mostra positividade em tais testes alegando que a EPEC clássica é um importante agente etiológico de diarreia em países em desenvolvimento com poucas condições de higiene. Geralmente é endêmica em cada lugar que ocorre (MARKS, 2003; ORSKOV e ORSKOV, 1992).

Os sorotipos geralmente são demonstrados por um teste de fluorescência que mostra uma lesão típica da EPEC *in vivo* ("attaching and effacing"). Devido à carência de meios de diagnóstico, poucos laboratórios tentam identificar esses microrganismos (MURRAY, 1999).

Os sintomas são severos, prolongados, com diarreia não hemorrágica, vômitos e febre em crianças e jovens. A infecção tem sido associada à diarreia crônica; seqüelas podem incluir má absorção, má nutrição, perda de peso e retardo no crescimento (MURRAY, 1999).

Os mecanismos de patogenicidade das EPEC demonstram uma aderência às células HEp-2 formando alguns grupamentos tridimensionais ou microcolônias na superfície da célula. Este tipo de adesão é denominado adesão localizada (AL), sendo típico de EPEC aparecendo após três horas de incubação (CAMPOS; TRABULSI, 1999; GOFFAUX, 2000). Esse padrão de aderência é tão característico e específico das estirpes de EPEC que pode ser usado como base para diagnóstico. A habilidade de exercer essa aderência localizada pode ser transferida para linhagens de *E. coli* não patogênicas de laboratório através da transformação do plasmídeo EAF (DONNENBERG, 2001).

No primeiro estágio, há uma associação não íntima da bactéria com a célula hospedeira, a qual é mediada por um pili (gene de virulência). Numa segunda fase, as bactérias ficam intimamente aderidas, em formações salientes da célula (pedestais), as quais não apresentam microvilosidades, devido a um rearranjo estrutural. A associação das bactérias com a célula hospedeira ativa a tirosinaquinase que aumenta o nível intracelular de Cálcio. A alteração de constituição da célula é devida à condensação de filamentos de actina no local da adesão (RIBEIRO, 2001; DEVINNEY, 2001). Histologicamente, outros estágios são vistos como a deformação de algumas microvilosidades e destruição de outras (CAMPOS; TRABULSI, 1999; SAYLERS; WHITT, 1994). Este tipo de lesão histológica foi vista pela primeira vez em suínos, recebendo a designação de “Attachment/ Effacement” ou lesão A/E. Estes termos são usados devido à íntima união (“Attachment”) que se faz entre a bactéria e a superfície da célula da mucosa intestinal e o desaparecimento ou como se apagam (“Effacement”) as microvilosidades das bordas das células, onde a bactéria se adere, induzindo a formação de pedestais em forma de copo compostas de proteínas citoesqueléticas

sobre as quais a bactéria permanece. (CAMPOS; TRABULSI, 1999; DONNENBERG, 2001; SUSSMAN, 1997). Outras bactérias têm capacidade de provocar o mesmo tipo de lesão tais como *Escherichia coli* entero-hemorrágica (EHEC), *Citrobacter freundii* e *Hafnia alvei* (CAMPOS; TRABULSI, 1999).

A formação das lesões A/E envolve genes plasmidiais, cromossomais e grande variedade de resposta celular. Tal plasmídio é denominado EAF (EPEC “adherence factor”), os genes de virulência mais conhecidos são *bfpA* e *per*. O *bfpA* é responsável pela síntese de subunidades que compõem a fímbria BFP (“bundle forming pilus”), um apêndice de superfície e o gene *per* (“plasmidic encoded regulator”), que regula a função dos genes cromossômicos, envolvidos na lesão A/L. Também o plasmídio EAF, transporta outro gene, cuja função não é conhecida, mas que tem importância, pois é a partir dele que se prepara a sonda EAF, utilizada na identificação de EPEC (CAMPOS; TRABULSI, 1999; SAYLERS ; WHITT, 1994; SUSSMAN, 1997).

Há uma proteína, intimina, cuja produção é regulada por gene cromossomal (*eae*), que promove a adesão íntima da bactéria com a célula epitelial (CAMPOS; TRABULSI, 1999; DONNENBERG, 2001; RIBEIRO, 2001).

O diagnóstico da infecção é feito pelo isolamento da EPEC das fezes em agar MacConkey. Os fatores de virulência são pesquisados através de sondas genéticas ou de PCR (MURRAY, 1997). Há também reações de aglutinação com anti-soros para a detecção dos vários sorogrupos e sorotipos. (CAMPOS; TRABULSI, 1999; RIBEIRO, 2001).

Quando a antibioticoterapia for necessária, deve-se fazer antibiograma, pois os sorotipos, muitas vezes, apresentam resistência (CAMPOS; TRABULSI, 1999).

Alguns sorogrupos de EPEC humana (O26, O44, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158) são ocasionalmente isolados de cães e gatos com diarreia, mas muito pouco se sabe sobre estas estirpes. Algumas linhagens *eae* positivas de cães foram também positivas para o gene *eae* B (denominado recentemente como *esp* B), de plasmídios que codificam fator de aderência EAF e o gene *bfp* A, parecidos com as estirpes de EPEC humana. Ainda assim, proteína *eae* obtida de amostras de cão foi encontrada ser sorologicamente relacionada com a *eae* de EPEC humana (BEUTIN, 1999). Segundo estudos de Nakazato et al. (2004), houve o isolamento de EPEC em fezes de cães com diarreia e cães sem diarreia, na cidade de Campinas, SP, Brasil. Dos cães com diarreia, foram isolados genes *eae*, mas não foram isolados genes para enterotoxinas, plasmídio EAF ou Shiga toxinas. Os genes *eae* positivos pertenciam a uma larga diversidade de sorotipos, incluindo O111:H25, O119:H2 e O142:H6, os quais são comuns entre as EPEC humanas.

Lesões AE foram detectadas em intestino de gatos com diarreia, porém o agente causal da diarreia não foi isolado. Em contraste, diferentes sorotipos de EPEC foram isolados de cães com diarreia. Ainda assim, a proteína *eae* obtida de estirpes de cães foi achada ser sorologicamente relacionada à *eae* de EPEC humana não de EPEC suína (BEUTIN, 1999). Segundo Nakazato et al., 2004, EPEC têm sido isoladas de cães, suínos, caprinos, coelhos, bovinos e gatos. O plasmídio EAF e o gene *bfpA* não têm sido detectados em EPEC de suínos, bovinos e coelhos, mas alguns isolados de EPEC de cães (DEPEC – “dog enteropathogenic *E. coli*”) e maioria típica de EPEC de origem humana albergam ambos, EAF e o gene *bfpA*.

3.5.4 *Escherichia coli* entero-hemorrágica (EHEC)

A *Escherichia coli* entero hemorrágica ou verocitotoxigênica foi descrita, pela primeira vez, em 1977 por sua habilidade em causar danos em cultura de células Vero (células de linhagens renais de macaco verde africano) (VTEC) (BEUTIN, 1999).

Produzem citotoxinas SLT-I ou VT-I ou STx I(“Shiga like toxin ou Verotoxin”) e SLT-II ou VT-II ou STx II que são tipos antigenicamente distintos. EHEC também são conhecidas como STEC por produzirem toxinas parecidas com *Shigella dysenteriae* tipo I. Estas toxinas são semelhantes na estrutura e na atividade biológica com a toxina produzida por *Shigella dysenteriae* tipo-1, vindo a denominação de “Shiga like” toxina, recentemente STx1 e STx2. (RIBEIRO, 2001).

Estão associadas com diarreias esporádicas, em crianças em países desenvolvidos não sendo uma doença fatal, e há casos de colite hemorrágica (HC), síndrome urêmica hemorrágica (HUS) e púrpura trombocitopênica e falha renal aguda em humanos (adultos e crianças), nas quais se torna mais grave. Em animais, VTEC tem sido mostrada em casos de diarreia em bovinos (VT II) e doença do edema em suínos (VTe) (HAMMERMUELLER, 1994; SAYLERS; WHITT, 1994; WOODWARD, 1992;). Raramente causa doença em gado ou carneiro, os quais são reservatórios de muitas amostras (OSRKOV; OSRKOV, 1992).

Ainda que este fator de virulência possa ser encontrado em muitos sorotipos diferentes (atualmente mais de 50), apenas poucos são bem caracterizados (CAMPOS; TRABULSI, 1999; ORSKOV; ORSKOV, 1992). O sorotipo mais comum e melhor caracterizado é o O157:H7, além do O26:H11. São encontrados em quase

todo o mundo, mas principalmente são descritos nos Estados Unidos e Canadá. Segundo Karch et al. (1997), na Alemanha, foi feito um estudo em um Hospital para crianças, entre 1991 e 1995, sendo descritos casos de diarreia não hemorrágica e HUS (Síndrome Hemolítica Urêmica), provocadas pela EHEC (SLT-I e SLT-II).

Em sua maioria, está associado com alimentos contaminados de origem bovina como carne crua ou mal cozida (doença do hambúrguer) e produtos lácteos não pasteurizados, que acontece nos países desenvolvidos (BEUTIN, 1996; TREVENA, 1996). Bovinos constituem o mais importante reservatório de VTEC O157:H7 os quais podem ser excretadas pelas fezes normais de animais sadios ou de fezes diarreicas (BEUTIN, 1996). A transmissão pode ser feita de pessoa para pessoa por via fecal – oral (CAMPOS; TRABULSI, 1999). Estas linhagens colonizam o trato gastrointestinal de bovinos e podem contaminar a carne no processo de trituração. Uma variedade de outros alimentos, tais como frutas, verduras e raízes têm sido envolvidas em surtos (DONNENBERG, 2001). Beutin et al. (1993) analisaram a prevalência de algumas propriedades de verotoxina (Shiga toxina) produzida por diferentes espécies de animais domésticos sadios. O alimento dos animais estava livre de antibióticos ou aditivos como promotores de crescimento em agricultura. VTEC foi bem menos frequentemente isoladas de animais não ruminantes (aves, suínos, cães e gatos).

STEC ou VTEC são ocasionalmente isoladas de fezes de cães saudáveis ou com diarreia, mas seu papel na diarreia canina ainda não é bem conhecido (BEUTIN, 1999). Dados de estudos feitos por Marks et al. (2003) indicaram que estirpes de *E. coli* carregando genes para Shiga-toxinas não são associadas à diarreia canina. Há pequena informação documentando o papel da O157:H7 em

cães especificamente, e apenas poucas pesquisas têm documentado o isolamento deste sorotipo das fezes de cães.

No Brasil, foi descrita em amostras fecais de bovinos, no Rio (CERQUEIRA¹, 1999 apud RIBEIRO, 2001, p. 21) proveniente de animais de exploração leiteira e uma de animal de corte. Apesar desta identificação, permanece incerta a participação da *E. coli* O157:H7 na ocorrência de doença humana e mesmo de animais, no Brasil (RIBEIRO, 2001). Estudo feito por Giraldi et al. (1990) com o objetivo de verificar a ocorrência de VT (SLT) produzida por estirpes de *E. coli* isoladas de doenças diarreicas de crianças na cidade de São Paulo, verificou um nível muito baixo de produção de citotoxina (1 em 466 estirpes de *E. coli* estudadas). Tal citotoxina não pertencia a sorotipos EPEC, EIEC ou EHEC. Não há dados da ocorrência de colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica na nossa comunidade.

As EHEC são diferenciadas de outras patogênicas pelos seus fatores de virulência que incluem a produção de Shiga toxinas (STxs) codificadas por bacteriófago, presença de ilha de patogenicidade (LEE) a qual carrega o gene *eaeA* (o qual codifica a intimina, proteína essencial para a ligação celular) e a presença do plasmídeo pO157 que carrega o gene *ehxA* (EHEC hlyA) que codifica hemolisina e enterohemolisina (DONNENBERG, 2001; FENG, 2000; GOFFAUX, 2000).

Cada toxina é composta de uma subunidade simples A (35 KDa) e cinco subunidades B (7,5 KDa). A subunidade B liga-se, especificamente ao globotriaosil ceramídeo (Gb3), glicolípido das células hospedeiras. A subunidade A, para ser enzimaticamente ativa, precisa liberar o fragmento tóxico de 27KDa, fragmento

¹ CERQUEIRA, A. M. F.; GUTH, B. E. C.; JOAQUIM, R. M.; ANDRADE, J. R. C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 111-121, 1999.

A1(componente responsável pela inibição de síntese protéica na célula hospedeira). Este fragmento é carregado por endocitose e transportado para o retículo endotelial, ou seja, endocitose mediada por receptor. Esse processo ocorre através das chamadas “coated pits”, que são depressões da membrana citoplasmática, revestidas por uma proteína fibrosa conhecida como clatrina. Complexos ligante-receptor da membrana plasmática são seletivamente internalizados. As subunidades B se ligam ao glicolípido Gb3 da membrana celular e a molécula da toxina é endocitada formando uma vesícula. A clatrina é despolarizada e a vesícula se funde com os lisossomos (talvez o fragmento A1 esteja envolvido com a quebra proteolítica e redução das pontes de bissulfeto da subunidade A). No citoplasma, o fragmento A1 interage com a subunidade 60 S ribossomo, impedindo a ligação do aminoacil-RNA transportador a esta subunidade (CAMPOS; TRABULSI, 1999). Ocorre a interrupção da síntese protéica das células infectadas e morte por apoptose.(SEARS; KAPER, 1996).

Receptores para VT são encontrados em células endoteliais. Tais células endoteliais dos rins parecem ser sensíveis à toxina. Acredita-se que Stx entre na circulação sistêmica depois da translocação no epitélio intestinal e dano das células endoteliais, o qual induz a ativação da coagulação em cascata, formação de microtrombos, hemólise intravascular e isquemia. (DONNENBERG, 2001).

As subunidades A e B das SLT I e SLT II são 55% e 57% idênticas, respectivamente, na sua seqüência de aminoácidos. As SLT causam um acúmulo de fluidos e dano histológico, e não inflamatório em alça intestinal ligada de coelho, diminuindo da absorção de NaCl (DONNENBEG, 2001).

3.5.5 *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC)

A pielonefrite é uma das doenças febris bacterianas mais comuns em crianças. Se não tratada apropriadamente, pode causar lesão renal irreversível levando a uma insuficiência renal. *E. coli* é causa primária de infecções do trato urinário. Fatores de virulência, tais como a fímbria P e o pili tipo 1 facilitam a adesão da bactéria nas células uroepiteliais. (CHEN, 2003).

As Uropatogênicas (UPEC) possuem vários tipos de adesinas. As fímbrias tipo 1, participam na colonização da bexiga e trato urinário inferior, contudo aumentam a suscetibilidade da bactéria aos neutrófilos. Receptores da fímbria tipo 1 estão presentes no epitélio bucal, intestinal e vaginal. Os receptores do hospedeiro são glicoproteínas uromucóides (Tamm – Horsfall). A adesina mais importante das amostras que infectam os rins é a fímbria P, pois causam as formas mais severas de infecções do trato urinário. Em alguns casos, a amostra fecal de fímbria P é a mesma isolada no trato urinário, o que suporta a hipótese que as UTI (“uropathogenic tract infection”) são ascendentes. A arquitetura do pili revela singular fator ligado às bactérias Gram negativas. Apresenta uma forma de fibra helicoidal com diâmetro de 5 nm ou flexível, fina com diâmetro de 2 a 5 nm. O gene *pap* codifica o pili P. Este gene constitui-se em um “cluster” de 11 genes que, juntos, regularizam e juntam as proteínas estruturais necessárias para compor a adesina de superfície (SUSSMAN, 1997).

O pili tipo 1 promove a colonização do trato vaginal, aumentando a oportunidade das linhagens de *E. coli* alcançarem a uretra e a bexiga femininas

(SAYLERS; WHITT, 1994). Sua prevalência pode ser mais de 71% nas pielonefrites e cistites associadas apresentando febre.

Estas fímbrias aderem-se a um receptor de membrana da célula do hospedeiro a-D-Gal (1-4) b-D-Gal (globobiose). A fímbria S é chamada assim por se ligar a um oligossacarídeo (sialosyl oligossacarídeo) que se apresenta na matriz extracelular. Ela se liga e estimula a produção de IL-6 pelas células do epitélio renal. Causam meningite neonatal, na presença de UTI. Outras não afimbriais (AFAI, AFAll e Dr), podem ser transportadas pelas uropatogênicas. Também apresentam hemolisinas (HlyA) (CAMPOS; TRABULSI, 1999) que apresenta uma família de citotoxinas, provocando a formação de poros nas células do hospedeiro, principalmente neutrófilos, mastócitos, basófilos, linfócitos e plaquetas. Nos animais, são mais letais que as não hemolíticas (SUSSMAN, 1997). As aerobactinas são plasmidiais (gene *aer*) e captam o ferro do hospedeiro por processo metabólico cujos sideróforos estão envolvidos. Sua maior virulência é causar septicemia (SUSSMAN, 1997).

A aderência é mais freqüente no epitélio urogenital canino do que fazem as linhagens isoladas de fezes de cães saudáveis (BEUTIN, 1999; WESTERLUND, 1987). A habilidade de aderir ao uroepitélio também é um importante fator em pielonefrite humana. A adesão é mediada por uma fímbria P, a qual liga-se a um grupo sanguíneo específico em células humanas. . Ao lado da fímbria P, que é codificada pelo gene *pap* (pilus associado a pielonefrite), linhagens de *E. coli* associadas com infecções urinárias humanas, possuem outras adesinas, as quais a patogênese permanece não clara. Outros fatores de virulência reconhecidos são a atividade hemolítica e a captação de ferro livre a qual a aerobactina tem requerido mais

atenção. Tais fatores de virulência ocorrem na mesma linhagem, as quais, provavelmente têm origem evolutiva em comum (WESTERLUND, 1987).

Infecção do trato urinário (UTI) é um problema significativo de saúde para cães assim como para os humanos. Se linhagens de *Escherichia coli* patogênica extra intestinal (ExPEC) que causam UTI e outras infecções extra intestinais em cães são também capazes de infectar humanos é uma importante questão não resolvida (JOHNSON, 2000).

O suposto reservatório de linhagens de *E. coli* que causam UTI é o próprio trato gastrointestinal. Cães têm sido propostos como um potencial reservatório de linhagens de *E. coli* que causam UTI em humanos. Isolados de fezes e urina caninas sobrepõem-se consideravelmente com isolados clínicos humanos com respeito ao grupo filogenético, sorogrupo O, e certos fatores de virulência associados com *E. coli* extraintestinal. Achados sugerem a possibilidade de uma troca zoonótica de *E. coli* patogênica entre cães e humanos (SANNES, 2004).

Low et al. (1988) sugeriram que um fenótipo de aglutinação atípica da maioria das linhagens de ExPEC canina *pap* positivas poderia ser devida à expressão da fímbria P contendo uma molécula diferente, presente na fímbria P de estirpes de ExPEC humana.

Sete fatores de virulência (FVs), incluindo pilus tipo 1 (*pil*), pilus associado com pielonefrite (*pap*), fímbria S (*sfa*), adesina afimbrial I (*afa I*), hemolisina (*hly*), aerobactina (*aer*) e fator citotóxico necrotizante 1 (*cnf1*) têm sido documentados realizar um importante papel na causa de UTI humanas. Estirpes de *E. coli* isoladas de cães e gatos com UTI têm alta prevalência de *hly* e grupamentos de 5 sorotipos incluindo O2, O4, O6, O7 e O18. Estes sorotipos, exceto o O7 são compartilhados com estirpes de UPEC humana. Além disso, linhagens de *E. coli* isoladas de cães e gatos

com UTI eram similares às estirpes de *E. coli* isoladas de UTI humana. *Pil* foi o fator de virulência mais comum encontrado entre as linhagens UPEC de cães e gatos tanto quanto aquelas isoladas de pacientes humanos. Além disso, esta fímbria é também freqüentemente observada em estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de cães e gatos sadios (KURAZONO, 2003; YURI, 1998).

3.5.6 *Escherichia coli* enteroagregativa (EaggEC)

As estirpes de *Escherichia coli* recebem esta denominação por formarem um padrão agregativo de adesão, quando se associam com as células Hep-2 e HeLa, como se fossem tijolos empilhados. É freqüente nas fezes de crianças sem sintomas ou com diarreia aguda, sem diferenças significativas entre os dois grupos de crianças. A diarreia é persistente, chegando a duração de 7 a 14 dias. EaggEC assemelham-se às ETEC na ligação que elas apresentam com as células do intestino delgado, não são invasivas e não causam mudanças histológicas nas células intestinais onde aderem. Primeiramente, diferem das amostras de ETEC em que não aderem uniformemente sobre a superfície da mucosa intestinal, mas tendem a agrupar-se em massas, em grupamentos (BEUTIN, 1995; CAMPOS; TRABULSI, 1999; SAYLERS; WHITT, 1994;).

As lesões causadas por estirpes de EaggEC são caracterizadas por hiperemia moderada do íleo e do ceco, edema das vilosidades do intestino delgado e o empilhamento das bactérias sobre o epitélio do hospedeiro (ainda não foi confirmado se é o que ocorre nas infecções humanas). Tais amostras produzem

uma fímbria cujo nome é AAF/I (“aggregative adherence fimbriae”), codificada por plasmídeo (fator de colonização) (CAMPOS; TRABULSI,1999). Nas suas amostras, foram descritas duas toxinas: uma termoestável, EAST-II, semelhante a STa da ETEC, provoca aumento do GMP cíclico intracelular. A segunda toxina, antigenicamente relacionada com uma hemolisina da *E.coli*, induz aumento de cálcio intracelular e a fosforilação de muitas proteínas da célula hospedeira (CAMPOS; TRABULSI, 1999; SAYLERS; WHITT, 1994).

A identificação das amostras faz-se pelo reconhecimento do padrão de adesão em cultura de células, sondas genéticas ou PCR. Mais recentemente, foi desenvolvido um teste rápido de identificação em meio líquido. Faz-se o cultivo de EaggEC em caldo Muller-Hinton, por agitação. As amostras formam grupos que são vistos como uma película na superfície do caldo (CAMPOS; TRABULSI, 1999). Assim como para as linhagens de EPEC e EIEC, não há esclarecimentos da importância deste grupo de agentes nas infecções nos animais (RIBEIRO, 2001). Não tem sido reportada em cães (CAMPOS; TRABULSI, 1999; SUSSMAN, 1997).

3.5.7 *Escherichia coli* que adere difusamente (DAEC)

Aderem difusamente à superfície das células He-La ou HE-p2. Alguns estudos epidemiológicos não demonstraram associação destas bactérias com diarreia, porém elas podem causar diarreia. Duas adesinas foram descritas. Uma de natureza fimbrial (F1845), que é codificada por cromossomo, e uma segunda

adesina, não fimbrial (AIDA-I), que é codificada por plasmídio (CAMPOS; TRABULSI, 1999).

Segundo Ribeiro (2001), o mecanismo de patogenicidade e o envolvimento deste grupo de agentes na ocorrência de diarreia no homem, bem como nos animais é incerta. Estudos foram feitos no Brasil, na investigação de EaggEC e DAEC, com crianças com diarreia e sem diarreia. Não foram observadas diferenças na ocorrência destas classes de *E. coli* em tais crianças.

3.6 Outros Fatores de Virulência

Outros fatores de virulência da *E.coli* têm sido investigados em infecções no homem e nos animais. O agente tem a capacidade de multiplicação em meio com restrição a ferro, produção de hemolisinas (alfa e enterohemolisina), multi - resistência aos antibióticos e fator necrotizante citotóxico (RIBEIRO, 2001).

3.6.1 Aerobactina

O íon ferro é usado para síntese de proteínas por microrganismos como a *E. coli*. Nos animais e no homem, o ferro é encontrado nas células sob a forma de ferritina e hemina, ou em fluidos extra-celulares complexado às proteínas, como transferrina e lactoferrina.

Determinadas linhagens de *E. coli* têm a capacidade de competir e disponibilizar o ferro no organismo animal ou mesmo adaptar-se à multiplicação em baixas concentrações de ferro. Algumas linhagens possuem diferentes mecanismos de captação de ferro, como a formação de exoproteínas (sideróforos ou hemolisinas). Tais exoproteínas são sintetizadas pelo microrganismo em baixas concentrações de ferro ou mesmo sua ausência. O complexo exoproteína – ferro é captado pela *E.coli* a partir de receptores específicos, localizados na parede bacteriana. Há linhagens de *E.coli* que produzem dois tipos de proteínas quelantes de ferro, as enterobactinas e aerobactinas. Sua biossíntese é determinada, basicamente por genes cromossômicos, mediada por complexos enzimáticos.

Tanto no homem como nos animais, não há um esclarecimento completo quanto à captação do ferro exógeno nas infecções por *E. coli*, mas acredita-se que seja um importante fator de virulência ligado a processos septicêmicos e extra-intestinais (RIBEIRO, 2001). A Aerobactina, sideróforo bacteriano, tem sido associada com estirpes de *E. coli* a qual causam pielonefrite e cistite em humanos (JOHNSON, 1987).

A lactoferrina é uma glicoproteína produzida por células epiteliais e fagocitárias da glândula mamária. Liga o ferro ao bicarbonato, restringindo a disponibilidade do ferro na glândula (RIBEIRO, 2001).

3.6.2 Hemolisina

Outra exoproteína é a alfa-hemolisina, que em altas concentrações, determina a formação de poros na membrana celular, especialmente das hemácias. A lise da célula provoca a liberação de ferro para o meio extracelular. Em menores concentrações, provoca a lise de neutrófilos, monócitos e linfócitos T periféricos, além de células epiteliais. Alguns autores consideram o termo citolisina para tal exoproteína, provocando infecções extra-intestinais. Estas linhagens alfa-hemolíticas, correspondem a cerca de 60% de *E. coli* nas infecções do trato urinário, peritonites, apendicites, meningites neonatais e septicemias, no homem.

Nos bovinos, causam sintomas entéricos, infecções urinárias e septicemias (RIBEIRO, 2001).

A enterohemolisina é um outro tipo de hemolisina produzida na fase estacionária de multiplicação da *E. coli* e é considerada instável no meio externo. Investigações têm relacionado esta hemolisina às VTs (humanas e de bovinos saudáveis ou com diarreia neonatal) (RIBEIRO, 2001).

3.6.3 Fator Necrotizante Citotóxico

Fator Necrotizante Citotóxico (NTEC) tem sido associado com infecções extraintestinais (septicemia e infecção do trato urinário) e enterites no homem e

animais. NTEC foi subdividido em CNF 1 e CNF 2. CNF 1 são mais comuns isolados de fezes normais e diarreicas de animais e humanos. CNF 1 é codificada pelo gene *cnf 1* que é cromossomal, muito próximo do gene da hemolisina. O gene *cnf 2* codifica CNF 2, que está localizada em um plasmídio. Com base na análise genética, ambas as toxinas são homólogas à toxina da *Pasteurella multocida*, importante na patogênese da rinite progressiva em suínos. Fatores característicos são a capacidade de produzir dermonecrose em pele de coelho, multinucleação, formação de células gigantes e morte celular (HeLa, Hep-2, Vero). A ocorrência de CNF está relacionada com um tipo especial de fímbria à produção de hemolisina e aos sorogrupos O2, O4, O6, O22, O32, O75, O78 e O88 (RIBEIRO, 2001; SEARS; KAPER, 1996).

CNF 1 altera o arranjo das F- actina e a tubulina na célula, diminuindo o número de microvilosidades no epitélio não intestinal e induz a célula epitelial a se transformar em um fagócito, habilitando a bactéria que é não invasiva. A mudança no citoesqueleto da célula leva-a ao desenvolvimento da multinucleação. Dados avaliados sugerem que CNF 1 induz a polimerização da actina por ativação da Rho GTPase e que a CNF 2 covalentemente modifica a Rho por mecanismo que não envolve a fosforilação do ADP (CAPRIOLI, 1987; SEARS; KAPER, 1996).

3.6.4 Fator – R

Evidências têm apontado que linhagens de *E.coli*, de origem animal, adquiridas por via oral, pelo homem, podem transferir o fator R às linhagens do mesmo organismo de origem humana (RIBEIRO, 2001).

Estudos têm estabelecido que bezerros, porcos e aves domésticas carregam linhagens de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos no seu trato alimentar e excretam grande número de estirpes resistentes em suas fezes e em suas carcaças depois da matança. A ocorrência desta *E. coli* em alimentos de origem animal é acreditada ser relacionada com o uso de agentes antimicrobianos em animais de produção para promoção de crescimento ou para propósitos terapêuticos ou profiláticos e constituem significativo reservatório de infecção para o homem. É importante salientar que tem sido expresso o potencial de transferência de estirpes resistentes e de fatores R de reservatórios animais para a flora intestinal humana, e que o consumo de carne crua de bovinos, suínos e frango tem se mostrado como uma grande rota de transferência. Pouca consideração tem sido dada ao papel dos animais domésticos, como os cães e gatos, na transferência de resistência dos coliformes aos humanos. Estudo feito com cães rurais e de cidade apontou que das *E.coli* isoladas de cães rurais, 52% foram resistentes a três ou mais antibióticos comparados com 37% das isoladas de cães urbanos. Um total de 64% dos isolados mostraram transferir seus determinantes de resistência por conjugação. (MINTON et al, 1983; MONAGHAN, 1981).

No entanto, poucos são os estudos com pequenos animais (cães e gatos), na transferência de estirpes de *E. coli* resistentes a antibióticos. Nas décadas de 70 e

80, estudos feitos em Dublin, Austrália e Califórnia, apontaram aumento da prevalência de estirpes de *E. coli* multiresistentes em amostras fecais de cães. (MONAGHAN, 1981).

Estirpes emergentes de *Escherichia coli* resistentes a antibiótico tornam o tratamento mais difícil e aumentam as complicações causadas por infecções pelas mesmas (SANNES, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODO

A coleta do material foi feita nas dependências dos Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) de Guarulhos, Cotia e Barueri, Estado de São Paulo. Foram colhidas amostras de fezes de 220 cães recolhidos pelos CCZ das cidades referidas. A escolha dos cães foi feita independentemente de raça, porte, idade ou sexo, levando-se em consideração o estado geral e a consistência das fezes que deveriam indicar ausência de diarreia.

O sacrifício dos animais em câmara de gás, foi precedido de protocolo de anestesia com uma combinação de Xilazina e Ketamina na proporção de 1:3, em Guarulhos. Em Cotia e Barueri, os animais foram sacrificados com aplicação intravenosa de T61. A coleta de amostras de fezes foi feita no momento em que os animais apresentavam sinais clínicos de anestesia, antecedendo ao sacrifício dos mesmos.

4.1 Coleta de amostras

A resenha foi feita durante a aplicação do anestésico. A coleta das fezes foi realizada com o auxílio de “swab” estéril introduzido profundamente ao intestino, após os animais estarem anestesiados.

4.2 Exames microbiológicos de amostras de fezes de cães

Os swabs encaminhados ao laboratório em condição de refrigeração onde foram submetidas aos exames microbiológicos que consistiram inicialmente no cultivo das mesmas em caldo BHI (Brain and Heart Infusion)¹, ágar sangue de carneiro (5%)² e ágar MacConkey³ com incubação em aerobiose, a 37°C com leituras a 24-96 horas. As amostras também foram cultivadas em ágar Sabouraud-dextrose⁴ com incubação em aerobiose, em temperatura ambiente e mantidas por um período mínimo de 7 dias. As amostras incubadas em caldo BHI, foram posteriormente semeadas em ágar sangue de carneiro (5%) e ágar MacConkey, sendo a incubação destas similares à descrita anteriormente para o cultivo inicial.

Os microrganismos isolados foram identificados de acordo com Lennette (1985) e classificados segundo Kreeger-van-rig (1984), Krieg e Holt (1994), Murray et al. (1999)

¹ Brain and heart infusion broth – Oxoid – Hampshire - UK

² Blood Agar base - Oxoid - Hampshire - UK

³ MacConkey Agar – Oxoid – Hampshire - UK

⁴ Sabouraud dextrose agar – Oxoid – Hampshire - UK

4.3 Estudo da presença de fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães sem diarreia utilizando a reação em cadeia da polimerase

A pesquisa de fatores de virulência das linhagens de *E.coli* isoladas das fezes de cães errantes foi realizada através de reação em cadeia da polimerase (PCR), no Laboratório de Sanidade Suína do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados os primers, comercialmente disponíveis, para detectar os genes que codificam os pili associados com pielonefrite (*pap*), aerobactina (*aer*), fator necrotizante citotóxico 1 (*cnf1*), fímbria S (*sfa*), adesina afimbrial I (*afa*), pili associados com hemolisina (*hly*), enterotoxina termo-lábil (LT), enterotoxina termo-estável (*STa* e *STb*) e verotoxinas (*VT1* e *VT2*). O tamanho dos amplicons e literatura relevantes são apresentadas no Quadro 1.

A extração do DNA foi realizada conforme descrito por Boom et al. (1990). A solução de amplificação padrão de PCR consistiu de 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, gelatina 0,001% (w/v), 200 µM de cada um dos desoxinucleosídeos trifosfatos, seqüências de primers e 0,5 U de Taq³ DNA polimerase, em um volume final de 25 µL. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose a 1,5% e examinados eletroforicamente após coloração com brometo de etídio. Foi utilizado um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp.

Genes codificadores das toxinas	Nome do primer	Sequencia do oligonucleotídeo (5'→3')	Tamanho do produto amplificado	Referência
LT	LTA-1 LTA-2	GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	696 bp	Schultz et al, 1994
STa	STI-1 STI-2	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG CTTGACTCTTCAAAAAGAGAAAATTAC	147 bp	Olsvik et al, 1993
STb	STb-1 STb-2	ATCGCATTCTTCTTGCATC GGGCGCCAAAGCATGCTCC	172 bp	Blanco et al, 1997
VT1	VT1-A VT1-B	GAAGAGTCCGTGGGATTACG AGCGATGCAGCTATTAATAA	130 bp	Pollard et al, 1990
VT2 hb ²	VT2-3 VT2-5	CCGTCAGGACTGTCTGAAAC GAGTCTGACAGGCAACTGTC	726 bp	Woodward et al, 1992
<i>Pap</i>	<i>pap</i> -1 <i>pap</i> -2	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	336 bp	Yamamoto et al. (1995)
<i>Hly</i>	<i>hly</i> -1 <i>hly</i> -2	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1177 bp	Yamamoto et al. (1995)
<i>Aer</i>	<i>aer</i> -1 <i>aer</i> -2	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG	602 bp	Yamamoto et al. (1995)
<i>Cnf</i>	<i>cnf</i> 1	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG	498 bp	Yamamoto et al. (1995)
<i>Sfa</i>	<i>sfa</i> -1 <i>sfa</i> -2	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410 bp	Yamamoto et al. (1995)
<i>Afa</i>	<i>afa</i> -1 <i>afa</i> -2	GCTGGGCAGCAAACTGATAACCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	750 bp	Yamamoto et al. (1995)

Quadro 1 - “Primers” utilizados na PCR para amplificar fragmentos de diferentes genes para enterotoxinas (LT, STa e STb) e ero citotoxinas (VT1, VT2 e VT2e) e de diferentes genes para *pap*, *sfa*, *afa*, *hly*, *aer* e *cnf*1.

4.3.1 Extração do DNA bacteriano

O protocolo para extração de DNA detalhado a seguir foi realizado segundo descrito por Boom et al. (1990).

Foram adicionados 200µL da cultura à um microtubo contendo 1 mL do tampão de lise (Tiocianato de Guanidina 120gr, Triton 100x 1 mL, Tris-HCl 0,1 M [pH 6,4] 111,2 mL, EDTA 0,5M 8,8 mL) e 40 µL da suspensão carreadora (1gr Terra diatomácea, HCl 50 µL e 5 mL água ultrapura). O microtubo foi agitado por 30 segundos e a zaragatoa foi retirada.

O microtubo contendo a suspensão do microrganismo foi agitado por 1 minuto e deixado sobre a bancada por 10 minutos. Passado este período o microtubo foi centrifugado por 90 segundos a 14.000 rpm. O sobrenadante obtido foi descartado e ao pélete formado foi adicionado 1 mL do tampão de lavagem (Tiocianato de Guanidina 120gr, Tris-HCl 0,1 M [pH 6,4] 100mL). O microtubo foi então agitado por 30 segundos e centrifugado por 90 segundos, o sobrenadante obtido foi descartado e o pélete novamente submetido a este procedimento. O pélete obtido após esta etapa foi submetido a duas lavagens com etanol (70%) e uma lavagem com acetona. Os microtubos contendo o pélete tratado com acetona foram mantidos em estufa a 37° C por 20 minutos. Após a completa secagem do pélete foi adicionado 100µL de tampão de eluição (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA [pH 8,0]) ao microtubo, este foi agitado por 1 minuto e mantido à 56°C por 10 minutos. Passado este tempo o microtubo foi centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm, o sobrenadante contendo o DNA foi armazenado em tubos limpos e numerados. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até sua utilização na PCR. A cada extração realizada utilizou-se como controle positivo uma amostra de *E.coli* sabidamente positiva.

4.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) específicos para *Escherichia coli* descritos por Stone et al. (1994) foram sintetizados pela Life Technologies (Miami).

Para a reação em cadeia da polimerase foi adicionado à um microtubo 40 pmoles de cada primer, 0,5 unidades de Taq polimerase (Life Technologies –Miami), 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0.001% gelatina, 200 µM de cada deoxiribonucleotídeo trifosfato, 5 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 25 µL. Para amplificação do DNA de *Escherichia coli* o termociclador foi programado para 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

A cada amplificação realizada, foi adicionado um controle positivo (contendo o DNA do agente) e um controle negativo.

4.3.3 Detecção do produto amplificado

Os produtos de PCR (10µL) foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (10µg/mL) e fotografados sob luz ultravioleta. O marcador de pares de bases utilizado foi o 100 bp DNA ladder (Life Technologies-Miami).

4.4 Teste de Susceptibilidade aos antimicrobianos

As colônias identificadas como *E. coli*, através de estudo microbiológico e separadas em caldo BHI, individualmente, foram submetidas a um teste de susceptibilidade a agentes antimicrobianos, pelo modo de difusão de disco. A solução de BHI com a colônia foi diluída em caldo BHI estéril, até obter a diluição 0,1 da escala de Mac Falland. Pipetou-se 0,1 mL da nova suspensão. Duas placas de Petri, contendo ágar Müller Hinton, foram usadas para distribuir tal quantidade de suspensão, em cada placa. O meio Müller Hinton foi esterelizado a 120°C por 15 minutos, em autoclave, antes de ser semeado com a solução contendo *E. coli*. Um conjunto de discos de antibióticos (que variou entre 4 a 7 antibióticos em cada conjunto) para bactérias Gram negativas foi colocado em cada placa contendo o ágar. Os antibióticos usados para o antibiograma foram Amoxicilina, Aztreonam, Amicacina, Ampicilina, Cefalotina, Cefoxitina, Cefotaxima, Cloranfenicol, Gentamicina, Sulfazotrin, Tetraciclina, Tobramicina, Enrofloxacina, Norfloxacina e Netilmicina (segundo método do "National Committee for Clinical Laboratory Standards" - NCCLS).

4.5 Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de Fischer, empregando-se o "software" GRAPHPAD INSTAT 1992-98.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a freqüência maior de *E. coli* (89,09%) como bactéria comensal dentre outros microrganismos do trato intestinal. Os fatores de virulência encontrados com significância estatística foram *aer*, *sfa* e *pap* associados à *Escherichia coli* uropatogênica. As amostras foram coletadas nos Centros de Controle de Zoonoses dos Municípios de Guarulhos, Cotia e Barueri, na região da Grande São Paulo no período de setembro de 2002 a outubro de 2004.

5.1 Exames microbiológicos de amostras de fezes de cães

De um total de 220 amostras de fezes, houve crescimento de microrganismos em 100% delas. Foram isolados os seguintes microrganismos: 54,54% (N=120) estirpes de *E. coli* em cultura pura e 76 (34,54%) estirpes em associação com outros agentes, *Proteus mirabilis* (2,27%), *Klebsiella pneumoniae* (2,27%), dentre outros microrganismos (Tabela 1). Deve-se ressaltar ainda o isolamento de leveduras (*Candida albicans*) em associação com outros agentes a partir de 05 (2,27%) amostras de *swabs* retais.

A freqüência de isolamentos de *E. coli* (89,09% ou 196 amostras) - considerando-se as amostras nas quais o agente foi isolado em cultura pura e também em associação com outros microrganismos - foi maior estatisticamente ($P < 0,05$) do que as freqüências de isolamentos de todos os outros microrganismos.

Tabela 1 - Quantidade de isolados, por gênero ou espécie, de bactérias e fungos obtidos a partir dos exames microbiológicos realizados com 220 swabs retais de cães.

Microrganismos Isolados	N	%
<i>E. coli</i>	120	54,55*
<i>E. coli</i> / <i>Proteus mirabilis</i>	23	10,45
<i>E. coli</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	3,64
<i>E. coli</i> / <i>Edwardsiella tarda</i>	6	2,73
<i>E. coli</i> / <i>Proteus mirabilis</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	2,27
<i>E. coli</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Staphylococcus</i> sp.	4	1,82
<i>E. coli</i> / <i>Proteus mirabilis</i> / <i>Staphylococcus</i> sp.	4	1,82
<i>E. coli</i> / <i>Staphylococcus</i> sp.	4	1,82
<i>E. coli</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Streptococcus</i> sp.	2	0,91
<i>E. coli</i> / <i>Proteus mirabilis</i> / <i>Candida albicans</i>	2	0,91
<i>E. coli</i> / <i>Proteus mirabilis</i> / <i>Edwardsiella tarda</i>	2	0,91
<i>E. coli</i> / <i>Pseudomonas</i> sp.	2	0,91
<i>E. coli</i> / <i>Candida albicans</i>	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Candida albicans</i> / <i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Candida albicans</i>	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Staphylococcus</i> sp. / <i>Streptococcus</i> sp.	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Proteus mirabilis</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Salmonella</i> sp.	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Proteus mirabilis</i> / <i>Streptococcus</i> sp.	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Proteus vulgaris</i> / <i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Providencia</i> sp.	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Proteus vulgaris</i>	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Shigella</i> sp.	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Staphylococcus</i> sp. / <i>Proteus vulgaris</i>	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Streptococcus</i> sp.	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Streptococcus</i> sp. / <i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	0,45
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	2,27
<i>Proteus mirabilis</i>	5	2,27
<i>Proteus mirabilis</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	0,91
<i>Salmonella</i> sp.	2	0,91
<i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Providencia</i> sp.	1	0,45
<i>Proteus mirabilis</i> / <i>Edwardsiella tarda</i>	1	0,45
<i>Proteus mirabilis</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Staphylococcus</i> sp.	1	0,45
<i>Proteus mirabilis</i> / <i>Salmonella</i> sp. / <i>Streptococcus</i> sp.	1	0,45
<i>Proteus mirabilis</i> / <i>Shigella</i> sp.	1	0,45
<i>Proteus mirabilis</i> / <i>Staphylococcus</i> sp.	1	0,45
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0,45
<i>Staphylococcus</i> sp.	2	0,91
<i>Staphylococcus</i> sp. / <i>Streptococcus</i> sp. / <i>Acinetobacter anitratus</i>	1	0,45
Total Geral	220	100,00

* verificou-se diferença estatisticamente ($P < 0,05$) significativa entre a ocorrência de *Escherichia coli* e os outros microrganismos isolados

5.2 Estudo da presença de fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães sem diarreia utilizando a reação em cadeia da polimerase

Um total de 196 linhagens de *E.coli* isoladas foram submetidas ao estudo da presença dos fatores de virulência de pili associados com pielonefrite (*pap*), aerobactina (*aer*), fator necrotizante citotóxico 1 (*cnf1*), fímbria S (*sfa*), adesina afimbrial I (*afa*), hemolisina (*hly*), enterotoxina termo-lábil (LT), enterotoxina termo-estável (STa e STb), verotoxinas (VT1 e VT2).

De um total de 196 estirpes de *E. coli* isoladas, em cultura pura ou em associação com outros agentes, 123 (62,75%) apresentaram um ou mais dos fatores de virulência estudados. Dessas 196 estirpes, 16 (8,16%) foram positivas para *afa*, 54 (27,55%) foram positivas para *sfa*, 38 (19,38%) foram positivas para *pap*, 66 (33,67%) foram positivas para *aer*, 31 (15,81%) foram positivas para *cnf*, 13 (6,63%) foram positivas para *hly*, 01 (0,51%) foi positiva para VT2 e nenhuma das linhagens foi positiva para LT, STa e STb (Gráfico 1).

Foi identificada a presença de fatores de virulência em 123 estirpes (62,75% das 196 linhagens analisadas), sendo que 61 destas (49,59%) apresentaram mais de um tipo de fator de virulência. Os fatores de virulência detectados com maior frequência foram *aer* (53,65%), *sfa* (43,9%) e *pap* (30,9%).

Os fatores de virulência *aer* e *sfa* apresentaram frequência de ocorrência estatisticamente maior que *afa*, *cnf*, *hly*, LT, STa, STb e VT. Por sua vez, *pap* apresentou frequência estatisticamente maior que *afa*, *hly*, LT, STa, STb e VT.

Legenda: pili associados com pielonefrite (*pap*); aerobactina (*aer*); fator necrotizante citotóxico 1 (*cnf1*); fímbria S (*sfa*); adesina afimbrial I (*afa*); hemolisina (*hly*)

Gráfico 1 – Distribuição da frequência de fatores de virulência encontrados nas linhagens de *E.coli* isoladas de amostras de fezes de cães.

5.3 Estudo da presença de resistência a agentes antimicrobianos em estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de cães sem sinais de diarreia

De um total de 207 estirpes de *E. coli* testadas frente aos antibióticos 118 linhagens foram submetidas à Amoxicilina (50,85% de resistência, ou seja, 60 linhagens); 193 às Aztreonam (12,44% de resistência – 24 linhagens), Amicacina (17,62% - 34 linhagens) e Gentamicina (13,99% - 27 linhagens); 187 à Ampicilina (77,01% - 144); 202 às Cefalotina (85,64% - 173), Cefoxitina (50,99% - 103), Cefotaxima (10,89% - 22), Sulfazotrin (15,42% - 31) e Tobramicina (16,34% - 33); 195 ao Cloranfenicol (8,72% - 17); 200 à Tetraciclina (48,50% - 97); 39 à Enrofloxacin (10,26% - 4); 41 à Norfloxacin (0,00% - 0) e 97 à Netilmicina 17,53% - 17) (tabela 2).

A Norfloxacin foi o antibiótico frente o qual observou-se a menor porcentagem de resistência ($P < 0,05$) quando comparada com os outros antibióticos, pois nenhuma estirpe de *E. coli* testada frente a este antibiótico foi resistente ao mesmo. Por outro lado, das 202 linhagens testadas frente à Cefalotina, 173 (85,64%) apresentaram-se resistentes. (Gráfico 2)

Tabela 2 - Frequências de resistência e sensibilidade de estirpes de *E. coli* isoladas de fezes normais de cães aparentemente saudáveis frente a diversos antimicrobianos.

Antimicrobiano (sigla)	Nº Estirpes	S		I		R	
		N	%	N	%	N	%
Amoxicilina (AMO)	118	51	43,22%	7	5,93%	60	50,85%
Aztreonam (ATM)	193	113	58,55%	56	29,02%	24	12,44%
Amicacina (AMI)	193	121	62,69%	38	19,69%	34	17,62%
Ampicilina (AMP)	187	26	13,90%	17	9,09%	144	77,01%
Cefalotina (CFL)	202	11	5,45%	18	8,91%	173	85,64%
Cefoxitina (CFO)	202	78	38,61%	21	10,40%	103	50,99%
Cefotaxima (CTX)	202	87	43,07%	93	46,04%	22	10,89%
Cloranfenicol (CLO)	195	164	84,10%	14	7,18%	17	8,72%
Gentamicina (GEN)	193	142	73,58%	24	12,44%	27	13,99%
Sulfazotrin (SUT)	202	152	75,62%	18	8,96%	31	15,42%
Tetraciclina (TET)	200	55	27,50%	48	24,00%	97	48,50%
Tobramicina (TOB)	202	121	59,90%	48	23,76%	33	16,34%
Enrofloxacina (ENO)	39	34	87,18%	1	2,56%	4	10,26%
Norfloxacina (NOR)	41	41	100,00%	0	0,00%	0	0,00%
Netilmicina (NET)	97	67	69,07%	13	13,40%	17	17,53%

Legenda: AMO (Amoxicilina); ATM (Aztreonam); AMI (Amicacina); AMP (Ampicilina); CFL (Cefalotina); CFO (Cefoxitina); CTX (Cefotaxima); CLO (Cloranfenicol); GEN (Gentamicina); SUT (Sulfazotirn); TET (Tetraciclina); TOB (Tobramicina); ENO (Enrofloxacina); NOR (Norfloxacina); NET (Netilmicina).

Gráfico 2 - Distribuição, em porcentagem, da sensibilidade e resistência a Antibióticos de estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de cães sem sinais de diarreia.

6 DISCUSSÃO

O isolamento de 89,09% *E.coli*, em cultura pura ou associação com outros microrganismos, demonstra que a frequência de ocorrência deste agente em fezes de cães hígidos é estatisticamente ($P<0,05$) maior do que dos outros agentes isolados.

Trevena et al. (1996) descreve um caso de diarreia sanguinolenta em um menino de um ano de idade que havia apresentado contato com animais de uma fazenda. Amostras de fezes dos animais e do menino apresentaram-se positivas para linhagens de *E. coli* O157, VT1 e VT2. Amostras das fezes de um pônei também apresentaram O157, VT1 e VT2. As estirpes VTEC O157 da criança, de um cão e de um pônei não apresentaram diferença por tipagem molecular. O autor conclui que os animais podem servir como potenciais vetores de transmissão da EHEC O157.

Staats et al. (2003) realizaram um estudo para determinar a possível correlação entre doença e a presença de genes toxigênicos de *Escherichia coli* em fezes diarreicas e não diarreicas de cães Greyhound. Detectaram o gene *stx2* (VT2) em ambos os grupos de cães.

Estudo feito por Nakazato et al. (2004) demonstrou que dos 146 cães estudados com diarreia, 20 apresentaram EPEC canina (DEPEC – “Dog Enteropathogenic *Escherichia coli*”); porém de 36 amostras de fezes de cães sem diarreia, três foram positivas para EPEC canina. Nenhuma das *E. coli* isoladas deste estudo apresentaram os genes que codificam LT I, STa, STb, Stx1 (VT1) e Stx2 (VT2).

No presente estudo, apenas uma amostra apresentou VT2 e não foram detectadas LTI, STb, e VT1, demonstrando a baixa frequência de *E. coli* produtora destas toxinas em animais sadios.

As ETEC apresentaram frequência de isolamento de 2,7 a 31,1% dos casos de diarreia, particularmente em cães jovens e não foram isoladas de grupos de cães saudáveis (BEUTIN, 1999), confirmando resultado do presente estudo, pois não foram detectados fatores de virulência para LT, ST.

Holland et al. (1999) analisaram 52 amostras de fezes de cães, filhotes, sadios (cinco meses de idade), e verificaram que 43 amostras apresentaram *Escherichia coli* com presença de genes *eae* e/ou STa. No presente estudo, em que não foi levada em consideração a idade dos animais, sendo que foi constituído principalmente por animais adultos, em nenhuma estirpe de *Escherichia coli* foi verificada a presença de STa. Entretanto, os achados de Holland. (1999) demonstram que isolados fecais de *E. coli* de cães sadios tem a possibilidade de possuir atributos de virulência que são considerados como marcadores de enteropatogenicidade.

Deve-se ressaltar ainda que, não foram detectados os fatores LT, STa e STb, tendo sido verificado VT2 somente em uma das estirpes analisadas, fatores de virulência estes associados a quadros de diarreia. Estes resultados confirmam os achados de Hammermueller et al. (1994) cujos estudos revelaram que genes para toxinas VT2, STa e STb não foram detectados em fezes de cães saudáveis.

Segundo Beutin (1999) as STEC (*Escherichia coli* verotoxigênica ou uropatogênica) foram ocasionalmente isoladas de fezes normais e diarreicas de cães, mas sua participação na diarreia canina ainda não foi devidamente esclarecida. Estirpes de *E. coli* uropatogênicas de cães foram similares às linhagens

uropatogênicas isoladas de fezes de humanos quanto aos seus atributos de virulência. O papel da patogenicidade destas estirpes é bem conhecido em relação aos fatores de virulência hemolisina (*hly*), aerobactina (*aer*), fímbria P (BEUTIN, 1999). Segundo este mesmo pesquisador, os cães devem apresentar um papel importante como reservatórios para outros animais e para o homem, pois estudos indicam a transmissão de linhagens uropatogênicas fecais entre humanos e cães. Entretanto, pouco se conhece sobre o modo de transmissão das *E. coli* uropatogênicas entre os diferentes hospedeiros mamíferos, levando-se à necessidade de outros estudos sobre este aspecto.

O grupo das *Escherichia coli* uropatogênicas (UPEC) está associado a doenças no trato urinário tanto em humanos como em animais. Grande parte das infecções de trato urinário tem início com a colonização do colón por uma estirpe de *E. coli* que tem a capacidade de causar infecções naquele sítio. As infecções de trato urinário em humanos, geralmente são causadas por linhagens uropatogênicas de *E. coli*, as quais possuem capacidade de adesão à mucosa da vesícula urinária, sendo que as adesinas mais importantes nestas situações são os *pili* (os genes que os codificam são designados *pap* - *pili* associado com pielonefrite). Além dos *pili*, existem as fímbrias S (*sfa*), que também se constituem em importantes adesinas no sítio mencionado (SAYLERS; WHITT, 1994). *E. coli* uropatogênicas podem apresentar a habilidade de adquirir ferro, o que também constitui importante fator de virulência, sendo que um dos mecanismos utilizados é o sideróforo, codificado pelo gene *aer* (SAYLERS; WHITT, 1994).

No presente estudo foram identificados fatores de virulência em 62,75% das linhagens avaliadas. Os fatores de virulência detectados com maior frequência foram

os genes *aer* (33,67%), *sfa* (27,55%) e *pap* (19,38%), os quais estão freqüentemente associados à casos de infecções urinárias e/ou genitais humanas.

Kurazono et al. (2003), apontaram a presença de genes *pap*, *sfa*, *afa*, *hly*, *aer* e *cnf* em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de fezes normais e urina de cães. Por sua vez, Féria et al. (2000) detectaram múltiplos fatores de virulência em estirpes isoladas de infecção do trato urinário de humanos, cães e gatos, sendo que aerobactina (*aer*) apresentou a maior freqüência entre os gatos, hemolisina (*hly*) entre os humanos e pili para pielonefrite (*pap*) entre os cães, sugerindo uma adaptação da *E. coli* uropatogênica aos receptores celulares de cada hospedeiro. No presente estudo por sua vez, os fatores de virulência encontrados com maior freqüência foram *aer*, *sfa* e *pap*, embora também tenham sido verificados, em freqüência inferior, a hemolisina (*hly*) e fator citotóxico necrotizante (*cnf*).

Pesquisa feita por Yuri et al. (1998) demonstra a presença de fatores de virulência incluindo pili associados com pielonefrite (*pap*), fímbria S (*sfa*), adesina afimbrial (*afa I*), alfa hemolisina (*hly*), fator citotóxico necrotizante 1 (*cnf 1*) e aerobactina (*aer*) em estirpes isoladas de urina de cães e gatos com UTI e fezes de animais saudáveis. Os métodos de diagnóstico usados foram PCR, sonda de DNA e bioensaio para hemaglutinação de eritrócitos de rato branco na presença de manose. Estes fatores de virulência são encontrados em estirpes humanas também. As estirpes de humanos e cães com UTI possuem fatores de virulência com maior freqüência do que aqueles encontrados em humanos e cães saudáveis, ao passo que gatos saudáveis, ocasionalmente os possuem.

Como *Escherichia coli* é um dos maiores agentes causais de infecções do trato urinário de humanos, tanto quanto de cães e gatos, é importante o seu conhecimento, pois cães e gatos são animais de companhia que freqüentemente

dividem o lugar onde vivem com os humanos. No presente estudo, os fatores de virulência mais encontrados foram uropatogênicos (*aer*, *sfa* e *pap*) indo de encontro ao observado por YURI et al, 1998, embora os animais estudados não apresentassem sinais clínicos de UTI.

Johnson et al. (2000) isolaram estirpes de *E.coli* a partir de amostras de fezes de cães coletadas no meio ambiente, exibindo traços de virulência e características filogenéticas típicas de *E.coli* patogênica extraintestinal humana (ExPEC). O gene detectado com maior frequência nestas estirpes foi *pap* que poderia ser diretamente relacionado com isolados clínicos de pacientes humanos com cistite, pielonefrite, bacteremias ou meningite neonatal. Neste estudo, o gene *pap* foi o terceiro fator de virulência isolado com maior frequência.

Estudo feito por Johnson et al. (2001) aponta semelhanças entre amostras de ExPEC (Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*) humana e canina com respeito aos fatores de virulência, dentro de cada tipo eletroforético, baseado no polimorfismo genético, mas não prova a transmissão cruzada entre as espécies ou exclui a possibilidade que humanos e caninos adquiram o mesmo tipo de *E. coli* de origem externa comum.

Vários estudos têm sido feitos em relação à resistência a agentes antimicrobianos pela *Escherichia coli*, principalmente em se tratando de animais de produção como bovinos, suínos e aves. Porém, pouca consideração tem sido dada ao papel desempenhado pelos pequenos animais, tais como cães e gatos na transferência de resistência de linhagens de origem animal para humanos (MONAGHAN, 1981).

Os isolados de cães produziram uma evidência sugerindo que animais de companhia podem ser um importante reservatório de estirpes de *E. coli* resistentes a

antibióticos, mostrando que mais estudos são requeridos para um maior esclarecimento do impacto do uso de antimicrobianos em medicina veterinária nestes animais na emergência de tais linhagens de *E. coli* (OLUOCH et al., 2001).

No presente estudo, não foi observada diferença estatística ($P < 0,05$) em relação à resistência aos diferentes antimicrobianos, das estirpes de *E. coli* quando considerados Aztreonam (12,44%), Amicacina (17,62%), Cefotaxima (10,89%), Cloranfenicol (8,72%), Gentamicina (13,99%), Sulfazotrin (15,42%), Tobramicina (16,34%), Enrofloxacina (10,26%) e Netilmicina (17,53%). Quando estes antimicrobianos são comparados com Amoxicilina (50,85%), Ampicilina (77,01%), Cefalotina (85,64%), Cefoxitina (50,99%) e Tetraciclina (48,50%), a resistência frente a estes foi estatisticamente maior. Agrupando os antimicrobianos com as porcentagens mais altas de resistência, Ampicilina e Cefalotina são os antimicrobianos frente os quais houve maior resistência em comparação com Amoxicilina, Tetraciclina, Cefoxitina.

Segundo Oluoch et al. (2001), a maioria das infecções extraintestinais causadas por *E. coli*, em cães envolve o trato urinário. Seus dados indicam que gentamicina, amicacina, norfloxacina e enrofloxacina apresentaram uma excelente eficácia contra *E. coli* (mais do que 85% dos isolados foram suscetíveis); cloranfenicol, ormetoprim, sulfametoxazol-trimetoprim, orbifloxacin e ciprofloxacin ainda são potentes drogas contra a *E. coli* (75% a 85% de suscetibilidade). Penicilina e seus derivados como amoxicilina, carbenicilina e ampicilina, juntas com tetraciclina e cefalotina, têm a mais pobre eficácia (menor que 64% susceptibilidade). Tais dados são próximos com o estudo presente, pois dos antimicrobianos testados, norfloxacina, enrofloxacina e cloranfenicol foram os mais eficazes (100%, 87,18% e

84,10% de susceptibilidade, respectivamente), além da baixa susceptibilidade da ampicilina (13,9%) e, cefalotina cuja susceptibilidade ficou em 5,45%.

Schroeder et al. (2002) observaram que, a frequência de resistência foi menor entre os isolados de animais que não são de produção de alimentos. Entre os animais de companhia, os isolados apresentaram 82% de resistência a Sulfametoxazol e 67% a Tetraciclina. No presente estudo a tetraciclina apresentou 48,5% de resistência, cujo dado é confirmado por Oluoch et al. (2001).

Sannes et al. (2004) fizeram estudo cujo objetivo foi comparar a prevalência e padrões de resistência a agentes antimicrobianos de estirpes de *E. coli* isoladas de cistite e pielonefrite em mulheres, fezes de humanos voluntários saudáveis e fezes de cão saudáveis. No total da população e dentro de cada grupo clínico, a resistência foi significativamente menos comum para isolados de pielonefrite humana do que isolados de fezes caninas. Em contraste, diferenças não significantes foram detectadas entre isolados de cistite e pielonefrite em relação aos antibióticos testados e entre isolados de fezes humanas e caninas. Dados obtidos no presente estudo, cuja origem é de fezes normais de cão, revelaram a susceptibilidade aos antibióticos de eleição para tratamento de infecções urinárias, tanto para humanos quanto para pequenos animais, tais como cães e gatos. No estudo de Sannes et al. (2004), os isolados de fezes caninas tiveram a menor prevalência de resistência aos antibióticos quando considerados todos os grupos estudados. Tais achados poderiam sugerir que cães não podem representar um importante reservatório de estirpes de *E. coli* resistentes a antimicrobianos e, assim, não expõem o ser humano que convive com tais animais a estas linhagens. Entretanto, é possível que cães possam adquirir estirpes de *E. coli* resistentes a antibióticos de humanos e vice-versa. Porém, mais estudos devem ser feitos para confirmar tal hipótese.

A possibilidade de que certas linhagens de *E. coli* sejam patogênicas tanto para humanos quanto para animais possui muitas implicações. Mais estudos devem ser feitos para identificar o modo como a transmissão pode ser feita entre cães e humanos e assim desenvolver mecanismos de prevenção da doença. Quando os animais domésticos apresentam capacidade de transmitir *E. coli* aos seres humanos, o uso de antimicrobianos na veterinária (sob a forma de clínica médica e/ou produção de alimentos) pode ser uma importante via para a aquisição de bactéria resistente aos antibióticos por humanos. Além disso, considerando-se a elevada frequência de ocorrência dos fatores de virulência identificados neste trabalho, como *aer*, *sfa* e *pap*, dever-se-ia proceder a outros estudos que avaliem a importância dos mesmos.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos neste estudo e os resultados obtidos, chegou-se às seguintes conclusões:

- Os microrganismos isolados com maior frequência das fezes de cães errantes pertencem à família *Enterobacteriaceae*, sendo a *Escherichia coli* a mais frequente de todas.
- Os cães aparentemente saudáveis, sem sintomas de colibacilose, poderiam estar participando da cadeia epidemiológica como reservatórios de *E. coli* uropatogênica ao homem, pois os genes encontrados com maior número foram *aer*, *sfa* e *pap* presentes em infecções extraintestinais, mais especificamente infecções urinárias.
- Os cães podem participar como reservatório de estirpes de *E. coli* resistentes a antimicrobianos.
- Dos antimicrobianos testados a Cefalotina foi o que apresentou a menor eficácia (85,64% de resistência) e a Norfloxacinina foi a mais eficaz (0%).
- Existe a necessidade de mais pesquisas sobre o modo de transmissão das *E. coli* patogênicas entre o cão e o homem e dos fatores de virulência uropatogênicos encontrados com maior frequência no presente trabalho, tais como *aer*, *sfa* e *pap*.

REFERÊNCIAS

- ACRES, S. D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 1, p. 229-255, 1993.
- BETTELHEIM, K. A.; HORNITZKY, M. A.; DJORDJEVIC, S. P.; KUZEVSKI, A. Antibiotic resistance among verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and non-VTEC isolated from domestic animals and humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Journal Medicine Microbiology**, v. 52, Pt-2, p. 155-162, Fev. 2003.
- BEUTIN, L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. **Veterinary Research**, v. 30, p.285-298, 1999.
- BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H.; ZIMMERMANN S.; SCHEUTZ F. Prevalence and some properties of Verotoxin (Shiga toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2483-2488, set.1993.
- BEUTIN, L.; GEIER, D.; ZIMMERMANN, S.; KARCH, H. Virulence Markers of Shiga – like Toxin- Producing *Escherichia coli* Strains Originating from Healthy Domestic Animals of Different Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 631-635, Mar. 1995.
- BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; GONZALEZ, E. A.; MORA, A.; JANSEN, W.; GOMES, T. A. T.; ZERBINI, F.; YANO, T.; PESTANA de CASTRO, L.; BLANCO, J. Genes Coding for Enterotoxins and Verotoxins in Porcine *Escherichia coli* Strains Belonging to Different O:K:H Serotypes: Relationship with Toxic Phenotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2958-2963, Nov. 1997.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILEN, P. M. E.; NOORDAA VAN DER J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, Mar. 1990.
- CAPRIOLI, A. ; FALBO, V.; RUGGERI, F. M.; BALDASSARRI, L.; BISICCHIA, R.; IPPOLITO, G.; ROMOLI, E.; DONELLI, G. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 146-149, Jan. 1987.
- CHEN, D. H.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29. p. 83-98, 2005.
- CHEN, M.; JAHNUKAINEN, T.; BAO, W.; DARE D.; CECCATELLI, S.; CELSI, G. Uropathogenic *Escherichia coli* Toxins Induce Caspase-Independent Apoptosis in Renal proximal Tubular Cells via ERK Signaling. **American Journal of Nephrology**, v. 23, n. 1, p. 140-151, Mai-Jun 2003.

CHEN, Y. M. M.; WRIGHT, P. J.; LEE, C. S.; BROWNING, G. L. Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. **Veterinary Microbiology**, v. 94, n. 1, p. 57-69, Feb. 2003.

CHRISTOPH, H.- J. **Clínica de las enfermedades del perro**. Zaragoza. España: Acribia, 1997. v. 2, p. 446.

DEVINNEY, R.; OUENTE, J.L.; GAUTHIER, A .; GOOSNEY,D.; FINLAY,B.B. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. **Molecular Microbiology**, v. 41, cap.6, p. 1445-1458, Jul. 2001.

DONNENBERG, M. S.; WHITTAM, T. S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **The Journal of Investigation**, v .107, n. 5, p. 539-548, Mar. 2001.

DROLET, R.; FAIRBROTHER, J. M.; HAREL, J.; HÉLIE, P. Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 58, n. 2, p. 87-92, 1994.

ETTINGER, S. J. **Textbook of veterinary internal medicine**. 3 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. v. 2, cap. 104, p. 1169-1232.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; MONDAY, S. R. Genetic analysis for virulence factors in *Escherichia coli* O104:H21 that was implicated in na outbreak of hemorrhagic colitis. **Journal of Clinical Microbiol**, v .39, n. 1, p. 24-28, Jan. 2001.

FÉRIA, C. P.; CORREIA, J. D.; GONÇALVES, J.; MACHADO, J. Detection of virulence factors in Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from humans, dogs and cats in Portugal. **Genes and Proteins Underlying Microbial Urinary Tract Virulence**, Edited by L. Emödy et al., Klumer Academic/Plenum Publishers, p. 305-308, 2000.

GIRALDI, R.; GUTH, B. E. C.; TRABULSI, L. R. Production of Shiga-toxin among *Escherichia coli* strains and other bacteria isolated from diarrhea in São Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1460-1462, Jun. 1990.

GOFFAUX, F.; CHINA, B.; JANSSEN, L.; MAINIL, J. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. **Research Microbiol**, v.151, p.865-871, 2000.

GRAPHPAD instant software. **Statistical analysis for personal computers**. S. I., 1992-1998.

GREENE, C. E. Gastrointestinal, Intra-abdominal, and Hepatobiliary Infections. In:---- --., **Clinical microbiology and infections diseases of the dog and cat**, Philadelphia: W. B. Saunders, 1984, p. 252-260.

GUTH, B. E. C.; RAMOS, S. R. T. S.; CERQUEIRA, A. M. F.; ANDRADE, J. R. C.; GOMES, T. A. T. Phenotypic and genotypic characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Membro do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p.1085-1089, dez. 2002.

HAMMERMUELLER, J.; KRUTH, S.; PRESCOTT, J.; GYLES, C. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolates from normal dogs and dogs with diarrhea. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 59, n. 4, p. 265-270, 1995.

HOLLAND, R. E.; WALKER, R. D.; SRIRANGANATHAN, N.; WILSON, R. A.; RUHL, D. C. Characterization of *Escherichia coli* isolated from healthy dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 70, p. 261-268, 1999.

JOHNSON, J.; DELAVARI, P.; STELL, A. L.; WHITTAM, T. S.; CARLINO, U.; RUSSO, T. Molecular comparison of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of the same eletrophoretic lineages from humans and domestic animals. **The Journal of Infections Diseases**, v .183, n. 1, p.154-159, Jan. 2001.

JOHNSON, J.; O'BRIAN, T. T.; LOW, D. A.; LING, G.; DELAVARI, P.; FASCHING, C.; RUSSO, T. A.; STELL, A. L. Evidence of commolality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express papG allele III. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3327-3336, Jun. 2001.

JOHNSON, J.; STELL, A. L.; DELAVARI, P. Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1306-1314, Mar.2001.

JOHNSON, L.; STELL, A. L.; DELAVARI, P.; MURRAY, A. C.; KUSKOWSKI, M.; GAASTRA, W. Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. **The Journal of Infections Diseases**, v .183, n. 15, p. 897-906, Mar. 2001.

KARCH, H.; HYPPERTZ, H.-I.; BOCKEMÜHL, J.; SCHMIDT, H.; SCHWARZKOPF, A.; LISSDNER, R. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in Germany. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 11, p. 1454-1557, 1997.

KERR, P.; BALL, H.; CHINA, B.; MAINIL, J.; FINLAY, D.; POLLOCK, D.; WILSON, I.; MACKIE, D. Use of a monoclonal antibody against na *Escherichia coli* O26 surfece protein for detection of enteropathogenic and enterohemorrhagic strains. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 4, p. 610-614, jul. 1999.

KNÖBL, T. **Caracterização epidemiológica, molecular e de virulência de *Escherichia coli* sfa + isoaldas de aves**. São Paulo, 2005. 100p. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

KREEGER-VAN-RIG, N. J. N. **The yeats a taxonomic study**. 3. ed. Amsterdan. Elsevier Science Publisher, 1984.

KRIEG, N. R.; HOLT, J.C. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994. 984 p.

KRUTH, S. A. Gram negative bacterial infections. In: GREENE, C. E. **Infections Diseases of Dog and Cat**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p. 217-222.

KURAZONO, H.; NAKANO, M.; YAMAMOTO, S.; OGAWA, O.; YURI, K.; NAKATA, K.; KIMURA, M.; MAKINO, S.; NAIR, G.B. Distribution of the usp gene in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from companion animals and correlation with serotypes and size-variations of the pathogenicity island. **Microbiololy and Immunology**. V .47, n. 10, p.797-802, 2003.

LENNETE, E. H.; HANSLER JR, W. J.; SHADOMY, H. J. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington American Society for Microbiology Press.1985. 4. ed. 1149 p.

LOW, D. A.; BRAATEN, B. A.; LING, G. V.; JOHNSON, D. L.; RUGY, A. L.. Isolation and comparasion of *Escherichia coli* strains from canine and human patients with urinary tract infections. **Infection Immunology**, n. 56, p. 2601-2609.

MARKS, S.L.; KATHER, E.J. Bacterial-associated diarrhea in the dog: a critical appraisal. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v .33, p. 1029-1060, 2003.

MINTON, N.P.; ATKINSON, T.M.J. The R-factors of multiple antibiotic resistant faecal coliforms isolated from a domestic dog. **Journal of Applied Bacteriology**, v . 55, p. 445-452, 1983.

MONAGHAN, C.; TIERNEY,U.; COLLERAN,E. Antibiotic resistance and R-factors in fecal coliform flora of urban and rural dogs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v .19, nº 2, p. 266-270, Fev. 1981.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.; TENOVER,F.C.; YOLKEN, R.H. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification. In: **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed. Washington: American Society for Microbiology. 1999, p.442-455.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In: **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed. Washington: American Society for Microbiology. 1999, p. 459-474.

NAKAZATO, G.; GYLES, C.; ZIEBELL, K.; KELLER, R.; TRABULSI, L.R.; GOMES, T.A .T.; IRINO,K.; DA SILVEIRA, W.D.; DE CASTRO, A .F.P. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E.coli* (EPEC). **Veterinary Microbiology**, v . 101, p. 269-277, Abril- 2004.

NICOLET, J. Enterobacteriaceae. *In: Compendio de Bacteriologia Medicina Veterinaria*, p. 04-16, 1985.

NISHIMURA, L.S.; GIRON, J.A .; NUNES, S.L.; GUTH, B.E.C. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains harboring the longus pilus gene in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v .40, nº 7, p. 2606-2608, Jul. 2002.

OLUOCH, A .º; KIM, C.; WEISIGER, R.M.; KOO, H.Y.; SIEGEL, A .M.; CAMPBELL, K.L.; BURKE, T.J.; MCKIERNAN, B.C.; KAKOMA,I. Nonenteric *Escherichia coli* isolates from dogs: 674 cases (1990-1998). **Journal American Veterinary Medicine Association**, v .218, nº 3, Fev. 2001.

ORSKOV, F.; OSRKOV,I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. **Canadian Journal of Microbiol.** V. 38, n. 7, p. 699-703, Jul. 1992.

PACHECO, A .B. F.; GUTH, B. E. C.; SOARES, K.C.C.; NISHIMURA, L.; ALMEIDA DE, D. F.; FERREIRA, L. C. S. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolates from humans. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 35, n. 6, p. 1521-1525, June, 1997.

PICHEL, M.G.; BINSZTEIN, N.; QUDRI,F.; GIRON, J.A . Type IV longus pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Occurrence and association with toxin types and colonization factors among strains isolated in Argentina. **Journal of Clinical Microbiology**, v .40, nº 2, p. 694-697, Fev. 2002.

POLLARD, D. R.; JOHNSON, H.L.; LIOR, H.; TYLER, S.D.; ROZEE, K. R. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. V.28, n. 3, p. 540-545, Mar. 1999.

RIBEIRO, M. G. **Fatores de virulência em linhagens de *E.coli* isoladas de mastite bovina clínica e sub-clínica.** São Paulo, 2001, 70p. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

SANNES, M.R.; KUSKOWSKI, M.A .; JOHNSON, J.R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains isolated from urine of women with cystitis or pyelonephritis and feces of dogs and healthy humans. Public Veterinary Medicine: Public Health. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v .225, nº 3, Agosto, 2004.

SAYLERS, A .A; WHITT, D. D. **Bacterial Pathogenesis: a molecular approach.** Library of Congress Cataloging in Publication Data. p. 190- 212. 1994.

SCHROEDER, C.M.; MENG, J.; ZHAO, S.; DEBROY,C.; TORCOLINI, J.; ZHAO, C.; MCDERMOTT, P.F.; WAGNER, D.D.; WALKER, R.D.; WHITE,D.G. Antimicrobial

resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, O145 from animals and humans. **Emerging Infections Diseases**, v .9, nº 1, dez. 2002.

SEARS, C.L.; KAPER, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiology Reviews**, v . 60, nº 1, p. 167-215, Mar. 1996.

STAATS, J.J.; CHENGAPPA, M.M.; DEBEY, M.C.; FICKBOHM B.; OBERST, R.O . Detection of *Escherichia coli* shiga toxin (*stx*) and enterotoxin (*estA* and *elt*) genes in fecal samples from non-diarrheic and diarrheic greyhounds. **Veterinary Microbiology**, v. 94, p. 303-312, Mar. 2003.

SUSSMAN, M. ***Escherichia coli: mechanisms of virulence***. United Kingdom. Cambridge University Press, 1997. 639 p.

TAUSCHEK, M.; GORRELL, R.J.; STRUGNELL, R.A .; ROBINS-BROWNE, R.M. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by a enterotogenic strain of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V .99, edição 10, p. 7066-7071, Maio, 2002.

TIZARD, I.R. *In: Imunologia Veterinária: uma introdução*. cap. 6, p. 51-63, 6ª ed. São Paulo, 2002.

TRABULSI, L. R.; CAMPOS, L. C. *Escherichia*. S/l: TRABULSI, L. S.; SOUZA, C. P. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 215- 228.

TREVENA, W.B.; HOOPER, R.S.; WRAY, C.; WILLSHAW, G.A .; CHEASTY, T.; DOMINGUE, G. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals. **The Veterinary Record**, p.400, april, 1996 .

TSUJI, H.; OSHIMA, K.; ISHIKAWA, K.; HAYASHI, K. An outbreak of heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* O25:HNM resistant to nalidixic acid caused by ingestion of contaminated box-lunch in september-october 2002 in Hyogo and shiga Prefectures. **Japanese Journal Infection Disease**, v .55, p. 205-206, 2002.

TYLER, S.D.; JOHNSON, W.M.; LIOR, H.; WANG, G.; ROZEE, K.R. Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v .29, nº 7, p. 1339-1343, Jul. 1991.

WADAS, B.; KÜHN, I.; LAGERSTEDT, S.; JONSSON, P. Biochemical phenotypes of *Escherichia coli* in dogs: comparison of isolates isolated from bitches suffering from pyometra and urinary infection with isolates from faeces of healthy dogs. **Veterinary Microbiology**, v .52, p. 293-300, 1996.

WESTERLUND, B.; PERE, A .; KORHONEN, T.K. Characterisation of *Escherichia coli* strains associated with canine urinary tract infections. **Research in Veterinary Science**, v .42, p. 404-406, 1987.

WOODWARD, M. J.; CARROLL, P.J.; WRAY, C. Detection of entero- and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 31, p. 251-261, 1992.

YAMAMOTO, S.; TERA, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **Immunology and Medical Microbiology**. V. 12, p. 85-90, 1995.

YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; ITO, I. A case of hemolytic uremic syndrome associated shiga toxin 2 -producing *Escherichia coli* O121 infection caused by drinking water contaminated with bovine feces. **Japanese Journal Infection Disease**, nº 55, p. 174-176, 2002.

YURI, K.; NAKATA, K.; KATAE, H.; YAMAMOTO, S.; HASEGAWA, A. Distribution of uropathogenic virulence factors among *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v .60, nº 3, p. 287-290, 1998.

YURI, K.; NAKATA, K.; KATAE, H.; TSOKAMOTO, T.; HASEGAWA, A. Serotypes and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v .61, nº 1, p.37-40, 1998.