

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Fatores de virulência, resistência antimicrobiana em isolados de
Escherichia coli provenientes do trato genito-urinário de humano
e das fezes de seus animais de companhia

Cleber Jacob Silva de Paula

Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das exigências
para obtenção do título de Doutor em
Microbiologia Agropecuária

Jaboticabal – SP – Brasil
Maio de 2012

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CLEBER JACOB SILVA DE PAULA, nascido em 17 de janeiro de 1978, na cidade de Ituverava – SP, graduado em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – UNESP- Jaboticabal. De 2002 a 2008 exerceu a sua profissão na Clínica Veterinária Arca de Noé em Ituverava - SP. Atualmente é docente da Faculdade de Medicina Veterinária da Faculdade Doutor Francisco Maeda – FAFRAM- Ituverava – SP. Em Setembro de 2007 obteve o título de mestre em Microbiologia pela Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP (Jaboticabal).

DEDICO

À minha esposa Carla (e ao nosso Felipe),

Sempre me incentivando com palavras de amor e carinho. Sua compreensão em meus momentos mais difíceis foi a força que necessitei para seguir em frente.

OFEREÇO

**Aos meus pais,
Alaor e lone**

Alicerce de toda minha formação, com dedicação e amor, não medindo esforços para minha formação, não só profissional, mas também no meu desenvolvimento como pessoa. Por eles tenho minha eterna gratidão.

**Aos meus irmãos,
Jayter e Cynthia**

Antes de tudo amigos fiéis, apoiando em cada momento minhas decisões mais importantes, meu muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para que este trabalho fosse realizado, de início me perdoem aquelas que por ventura tenho me esquecido.

Em primeiro lugar a Deus, que sem Ele não somos nada.

Ao professor Marin pelo apoio e confiança depositados desde o início, além dos ensinamentos científicos e de retidão.

À Carla pela paciência e apoio nos momentos mais difíceis e sua compreensão às vésperas do casamento e do nascimento de Felipe, nosso bem mais precioso.

Aos meus pais e irmãos, pois sem família um homem nunca pode ser completo, e suas contribuições com palavras de incentivo em sempre seguir em frente.

À Marly, Marisa e Juliana, belíssima equipe da clínica veterinária Arca de Noé, que não mediram esforços para que esta etapa de minha vida fosse cumprida.

À Tânia, pessoa sempre disposta a ajudar e presente nas minhas correrias dentro do laboratório.

Ao professor Fernando Ávila por abrir as portas de seu laboratório e aos seus pós-graduandos, em especial ao amigo **Renato, a Clarissa e Lívia**, colaborando com o desenvolvimento das PCRs, ERIC-PCR e as tentativas do PFGE.

À toda equipe da saúde de Ituverava, em especial ao Sérgio, como secretário da saúde do município e amigo e à Maura, juntamente com toda sua equipe do laboratório municipal.

À FAFRAM, em especial ao diretor e companheiro **Márcio Pereira** e a coordenadora do curso de medicina veterinária **Elzylene Léga** por todo suporte oferecido por eles.

À todos os professores que participaram de forma direta ou indireta nesta etapa profissional.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da FCAV-UNESP de Jaboticabal, que estavam sempre dispostos a resolverem os eventuais problemas ocorridos neste período.

Aos pacientes, sejam eles humanos ou animais, pois todos foram fundamentais para a realização deste trabalho

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 <i>Escherichia coli</i>	2
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> Patogênica Extraintestinal (ExPEC).....	2
2.2 Infecção do Trato Urinário.....	3
2.3 Fatores de Virulência.....	5
2.3.1 fimH.....	6
2.3.2 iucD.....	7
2.3.3 pap.....	7
2.3.3.1 papGII.....	8
2.3.4 hlyF.....	8
2.3.5 usp.....	8
2.3.6 cnf1.....	9
2.3.7 iss.....	9
2.3.8 tsh.....	10
2.3.9 afa.....	10
2.3.10 sfa.....	10
2.4 Caracterização molecular bacteriana.....	11
2.5 Resistência Antimicrobiana.....	12
3- OBJETIVOS	14
4- MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Coleta.....	14
4.2 Isolamento e identificação.....	15
4.3 Preparação do DNA Bacteriano para Amplificação.....	16
4.4 Procedimento da PCR para a detecção dos genes.....	17
4.5 Pesquisa de semelhanças genéticas nas <i>E. coli</i> de origem humana e animal..	18
4.6 Resistência Antimicrobiana.....	19
5- RESULTADOS	20

5.1 Pesquisa de genes precursores de fatores de virulência.....	20
5.2 Pesquisa de cepas semelhantes.....	27
5.3 Resistência a antimicrobianos.....	29
6- DISCUSSÃO.....	33
7- CONCLUSÕES.....	37
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
9- SUMMARY.....	48
10- ANEXOS.....	49

Lista de Abreviaturas

afa: gene - Adesina Afimbrial
E. coli: *Escherichia coli*
ExPEC: *Escherichia coli* Patogênica Extraintestinal
FV: Fator de Virulência
ITU: Infecção do Trato Urinário
UPEC: *Escherichia coli* Uropatogênica
ATP: Adenosina trifosfato
BHI: Brain Heart Infusion
°C: Graus Celsius
Caldo EC: Caldo *Escherichia coli*
CNF: Fator Necrozante Citotóxico
DNA: Ácido desoxirribonucléico
g: Grama
LB: Luria Bertani
ml: Mililitro
PAI: Ilha de Patogenicidade
pap: gene - pili associada a pielonefrite
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
P/V: Peso/Volume
q.s.p.: Quantidade suficiente para
RNA: Ácido ribonucléico
sfa: gene - Adesina S Fimbria
fimH: gene - fímbria do tipo 1
iss: gene - Increased serum survival
usp: gene - uropathogenic-specific protein
iucD: gene - iron uptake chelate

hlyF: gene - “hemolysin”

tsh: gene - “temperature-sensitive haemagglutinin”

cnf1: gene - Fator Necrozante Citotóxico

dNTP: Deoxinucleotídeo trifosfatado

ERIC-PCR: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR

µl: microlitro

pb: pares de bases

pH: potencial hidrogenionico

RPM: rotações por minuto

UPEC: *Escherichia coli* uropatogênica

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 01- PCR multiplex: combinação de primers para detecção de genes de virulência, temperatura de anelamento e tamanho dos ensaios amplificados.....	18
Tabela 02- Fatores de virulência testados a partir da PCR para os isolados de origem urinária humana e fecal de cães e gatos, para os 11 genes testados.....	20
Tabela 03- Prevalência de genes codificadores de fatores de virulência determinados por PCR em isolados de <i>E. coli</i> isolados de humanos com ITU (n= 59) e das fezes de seus animais de estimação (n=51).....	25
Tabela 04- Padrões de virulência de <i>Escherichia coli</i> isolados de humanos (ITU) e seus respectivos animais de companhia (fezes).....	25
Tabela 05- Caracterização da presença de determinantes de virulência, expressos na quantidade de genes e da presença dos fenótipos de resistência dos isolados de ITU humana e fezes dos animais de companhia na cidade de Ituverava, SP, Brasil.....	30

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01- Prevalência de genes de virulência de um total de 59 isolados de <i>Escherichia coli</i> de origem de ITU humana e 51 fecais de seus respectivos animais de estimação.....	23
Figura 02- Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado a esquerda. Canaleta 1: marcador de peso molecular _X174 RFDNA – digestão com Hae III; Canaleta 2: controle positivo iucD + e fimH +; Demais canaletas isolados fimH positivos e isolados C14.4, H33.9, H33.10, H33.8 e C34.9 iucD + e fimH +.....	24
Figura 03- Gel de eletroforese de ERIC-PCR, onde ladder é um padrão de corrida, seguidos pelos isolados de origem humana e animal com enquadramento de cada par testado. A seta evidencia ponto de dissimilaridade. Foto com inversão de fundo para melhor visualização.....	27
Figura 04- Gel de eletroforese de ERIC-PCR, onde ladder é um padrão de corrida, seguidos pelos isolados de origem humana e animal com enquadramento de cada par testado. As setas evidenciam ponto de dissimilaridade. Foto com inversão de fundo para melhor visualização.....	27
Figura 05- Gel de eletroforese de ERIC-PCR, onde ladder é um padrão de corrida, seguidos pelos isolados de origem humana e animal com enquadramento de cada par testado. As setas evidenciam ponto de dissimilaridade. Foto com inversão de fundo para melhor visualização.....	28
Figura 06- Susceptibilidade antimicrobiana dos 59 e 51 isolados de <i>Escherichia coli</i> de origem humana e animal, respectivamente em Ituverava, SP, BR.....	29
Figura 07- Distribuição da multiresistência para 11 agentes antimicrobianos entre os 59 e 51 isolados de <i>E. coli</i> de humanos e animais, respectivamente na cidade de Ituverava, SP, Brasil.....	30

FATORES DE VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ISOLADOS DE *Escherichia coli* PROVENIENTES DO TRATO GENITO-URINÁRIO DE HUMANO E DAS FEZES DE SEUS ANIMAIS DE COMPANHIA

RESUMO - De 2008 a 2011 foram isoladas 110 cepas de *Escherichia coli*, sendo 59 a partir de urina de mulheres com ITU bacteriana. Os outros 51 isolados foram coletados por meio de swabs anais dos respectivos animais de estimação. Foram pesquisados por PCR a presença de genes de virulência e os genes mais encontrados foram o hlyF (44,06%), iss (42,37%) e fimH (100%) e hlyF (13,72%), iss (11,76%) e fimH (96,07%) entre as cepas de origem humana e animal, respectivamente. Foi realizada também a técnica de ERIC-PCR, onde pode observar dissimilaridades genéticas entre estes dois grupos bacterianos estudados, dando fortes indícios de que a transmissão no presente trabalho esteve ausente. Foram realizados antibiogramas a partir de cada um dos cinco isolados de cada amostra encontrando maior número de cepas resistentes em mulheres que nos animais em 8 dos 11 antimicrobianos testados, as maiores resistências para as cepas de origem humana foram o ácido nalidíxico e o ciprofloxacino com 97,14% e para as de origem animal a amoxicilina / ácido clavulânico e ampicilina com 74,28% e 68,57% respectivamente. As cepas de origem humana apresentaram também maiores índices de multirresistência que dos animais com 71,42% e 40%, respectivamente. Estas diferenças entre as resistências fortalecem a hipótese de que a origem das bactérias causadoras de ITU em mulheres não é de seus respectivos animais de companhia.

Palavras-chave: multirresistência, transmissão, cães, infecção do trato urinário.

1. INTRODUÇÃO

Infecções do trato urinário (ITU) causam prejuízos aos pacientes e aos sistemas de saúde pública, devido a sua alta incidência e morbidade. As mulheres são as mais acometidas por apresentar fatores predisponentes como, por exemplo, a conformação anatômica que favorece a estase urinária. Estudos já demonstraram várias causas para esta afecção, porém poucos são os estudos que se preocupam com a origem do agente causador.

Descrita pela primeira vez, por Theodor Von Escherich em 1885, a *Escherichia coli* é uma bactéria que tem chamado a atenção na saúde pública, principalmente quando se trata de ITU, uma vez que este patógeno é responsável por cerca de 80% deste tipo de infecção. Atualmente, com a proximidade cada vez maior de humanos com seus respectivos animais de estimação, há um interesse muito grande em se definir a possibilidade de transmissão desta bactéria. A identificação de cepas patogênicas presentes na microbiota intestinal de cães e gatos saudáveis gera uma forte suspeita de uma circulação destas entre humanos e animais e assim causar infecção quando atinge um sítio favorável do hospedeiro.

Quando se fala em transmissão de cepas entre humanos e animais devemos lembrar que na verdade há um intercâmbio genético, ou seja, uma bactéria pode apresentar fatores de virulência extraintestinais e permanecer na microbiota animal sem causar quaisquer danos a este hospedeiro. Além do aspecto de favorecimento de instalação da ITU devemos pensar também na possível resistência antimicrobiana que estas bactérias podem portar pelo simples fato de estarem sendo selecionadas a cada antibiótico administrado por uma prescrição ou simplesmente quando o proprietário do animal julgar necessário.

O presente trabalho busca complementar o entendimento sobre a presença de cepas patogênicas extraintestinais em material de origem intestinal dos animais de estimação, presença de resistência a antimicrobianos e a possível transmissão destas entre humanos e animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Escherichia coli*

Inicialmente denominada de *Bacterium coli*, a *Escherichia coli* foi descrita pela primeira vez por Theodor Von Escherich em 1885. Por fazer parte da microbiota intestinal da maioria dos animais e do homem, foi por muito tempo considerada não patogênica. No entanto esta enterobactéria vem sendo associada a infecções localizadas e sistêmicas tanto em seres humanos quanto em animais (KONEMAN *et al.*, 1997). Esta bactéria tem vindo a desenvolver mecanismos de virulência e de resistência aos antimicrobianos mais utilizados não só na rotina clínica, mas também de forma indiscriminada, tornando-se um problema de saúde pública com importantes implicações econômicas e sociais.

2.1.1 *Escherichia coli* patogênica extraintestinal (ExPEC)

A ExPEC é um grupo que se distingue das *E. coli* comensais e patogênicas intestinais, são cepas que parecem ser incapazes de causar doenças entéricas, mas podem colonizar o trato intestinal e devem constituir aproximadamente 20% das cepas predominantes em indivíduos saudáveis (JOHNSON, 1991). É considerada uma cepa especializada, que se caracteriza principalmente pela presença de múltiplos fatores de virulência (FV), tais como: hemolisina, adesinas e fímbrias. Para caracterização de uma cepa como ExPEC é necessário que ela possua pelo menos dois FV e estabeleça infecção em indivíduos saudáveis, e não simplesmente causar infecção extraintestinal (JOHNSON & RUSSO, 2002; RUSSO & JOHNSON, 2000). São estes fatores que possibilitam a colonização da bactéria na superfície da mucosa do hospedeiro subvertendo seus mecanismos de defesa a fim de obter nutrientes essenciais como, por exemplo, o ferro, facilitando a instalação da infecção.

Doenças induzidas por ExPEC representam uma grande problema em termos de custos médicos e perdas de produtividade, além de causar doenças em humanos, causam infecções extraintestinais em animais (SMITH et al. 2007).

As estirpes de *Escherichia coli* capazes de causar doença fora do trato gastrointestinal pertencem a um grupo diverso referido como *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC). As estirpes ExPEC são responsáveis por uma variedade de doenças, incluindo infecções do trato urinário, meningites neonatais, septicemia, pneumonia nosocomial, infecção intra-abdominal, osteomielites e infecções de feridas. *E. coli* uropatogênica (UPEC), um membro proeminente da família de ExPEC, é responsável por mais de 90% de infecções do trato urinário simples em indivíduos normalmente saudáveis (BRANGER, 2005).

2.2 Infecção do Trato Urinário

As infecções do trato urinário (ITU) estão entre as mais comuns de todas as infecções vistas na prática clínica; vencidas apenas pelas infecções respiratórias, elas são responsáveis por três milhões de visitas a consultórios médicos nos Estados Unidos (ORENSTEIN, 1999). Alguns estudos indicam que aproximadamente 50 a 70% das mulheres apresentam pelo menos um episódio de ITU, sendo que, 20 a 30% destas apresentam episódios recorrentes (GUPTA, et al, 2001).

A maior susceptibilidade à infecção no sexo feminino é devida às condições anatômicas: uretra mais curta e sua maior proximidade com a vagina e ânus. Outros fatores que aumentam o risco de ITU nas mulheres incluem: episódios prévios de cistite, o ato sexual, o uso de certos géis espermicidas, a gestação e o número de gestações, o diabetes (apenas no sexo feminino) e a higiene deficiente, mais freqüente em pacientes com piores condições socioeconômicas e obesas. (BRUMMFITT, 1987).

A real incidência de ITU é subestimada porque pelo menos metade de todas as infecções urinárias se resolve sem atenção médica (POLETTO & REIS, 2005). Já a recorrência de ITU após a primeira infecção acontece em 50% das mulheres durante

o primeiro ano de seguimento, e em 75% dos casos no período de dois anos de evolução.

As ITUs adquiridas na comunidade quase sempre são causadas por microrganismos da microbiota intestinal normal, sendo a *Escherichia coli* a bactéria mais freqüentemente isolada. Outras bactérias encontradas são *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*. Estes agentes infecciosos alcançam a bexiga mais facilmente através da curta uretra feminina do que da uretra masculina mais longa (BLACK, 2002, TRABULSI, 2002).

O principal risco oferecido pela colonização das ExPEC no intestino humano é a transferência horizontal dos fatores de virulência, que podem converter as cepas comensais em potenciais cepas patogênicas, e assim, causar infecção em outros sítios estéreis como, por exemplo, o trato urinário causando ITU. Estas cepas constituem cerca de 20% das cepas predominantes em indivíduos saudáveis. Os fatores responsáveis por esse processo representam um mistério para a comunidade científica (JOHNSON et al, 2001).

O agente etiológico mais comum causador de ITU em pacientes ambulatoriais e hospitalizados é *E. coli*, responsável por 75 - 90% dos isolados de ITU não complicadas (GUPTA et al, 2001; KARLOWSKY et al, 2002).

Existe uma ampla variedade de manifestações clínicas, como ardência ao urinar, incontinência urinária, dor e febre entre outras associadas a ITU, assim como a recorrência da infecção e o aparecimento de seqüelas. Os fatores relacionados a susceptibilidade individual e os fatores de virulência das bactérias explicam esta variabilidade (SOBEL, 1991). Desta maneira o conhecimento aprofundado destas bacterias podem ajudar a prevenir tal mal.

Embora cães têm sido propostos como carreadores de ExPEC com infecção potencial para humanos, presume-se diferença de hospedeiro espécie-específica entre cepas de ExPEC caninas e humanas tem questionado esta hipótese (JOHNSON et al. 2000).

JOHNSON et al (2001) analisaram fezes de cães coletadas no ambiente e concluíram que as ExPEC apresentavam clones de virulência conhecidos e tinham

alta prevalência nestas amostras, além disso sugeriu a hipótese do cão ser um importante reservatório de ExPEC para transmissão em humanos.

A transmissão de ExPEC em membros de mesma família, incluindo seus animais de estimação podem contribuir na patogenia da infecção do trato urinário (ITU), mas isto ainda é pouco estudado. JOHNSON & CLABOTS, em 2006, demonstraram que clones de *E. coli*, inclusive ExPEC podem transitar entre membros humanos e animais da família, mesmo sem contato sexual, sugerindo a circulação entre todos os indivíduos que coabitam uma residência.

Animais de estimação podem ser reservatórios naturais de vários organismos potencialmente causadores de doença em seres humanos, especialmente as crianças são as mais afetadas neste jogo de transferência de genes, uma vez que elas não apresentam os devidos cuidados com a higiene (RODRIGUES et al, 2004).

2.3 Fatores de Virulência

Acredita-se que a transferência genética horizontal é essencial para a evolução adaptativa de espécies bacterianas. A quantidade de material genético que tem sido adquirido por transferência genética horizontal é inesperadamente elevada em várias bactérias patogênicas (LLOYD et al, 2007) A aquisição de plasmídeos e bacteriófagos também tem um papel importante na geração da diversidade genômica e sua manutenção. Se o novo DNA adquirido conferir uma vantagem para o organismo, então fica retido e pode ser estavelmente integrado no genoma através de processos de seleção natural. Apesar de existirem estirpes UPEC no trato intestinal do homem, estas são distintas da maioria das estirpes de *E. coli* comensais uma vez que possuem fatores específicos que permitem o sucesso da sua transição do trato intestinal para o trato urinário (LLOYD et al, 2007).

UPEC apresentam vários genes de virulência, incluindo adesinas fimbriais (tipo 1, P e S), toxinas (fator necrótico citotóxico 1 [*cnf1*], hemolisina e toxina autotransportadora secretada), e múltiplos sistemas de aquisição de ferro (SILVEIRA et al, 2001)

A bactéria expressa, freqüentemente, múltiplas adesinas durante a infecção de forma a favorecer a agregação de nichos específicos no trato urinário. Está demonstrado que as fímbrias do tipo 1, fatores de virulência de fase variável envolvidos na aderência, são das adesinas mais expressas durante uma infecção urinária. As fímbrias, também conhecidas como *pili*, são formadas por subunidades protéicas repetidas, numa estrutura compacta de forma helicoidal, formando apêndices que se estendem à superfície bacteriana. As adesinas fimbriais podem ser rígidas ou flexíveis. Há, também, outras proteínas de membrana constituintes da cápsula que funcionam com adesinas não fimbriais (SNYDER, 2005).

A aderência a tecidos do hospedeiro é normalmente o primeiro passo na colonização, sendo as adesinas essenciais na patogênese. Muitas adesinas fimbriais e não fimbriais são de fase variável, incluindo a fímbria tipo 1 codificada pelo grupo de genes *fim*. As fímbrias de tipo 1, que são comuns em quase todas as estirpes UPEC, ligam-se a glicoproteínas contendo manose em várias células do hospedeiro, incluindo o epitélio da bexiga, via a adesina fimbrial. Apesar de ser importante na adesão, a fímbria pode também ter um papel específico na ligação a células uroepiteliais e sua invasão (BRYAN et al, 2006).

A aderência das bactérias aos tecidos do hospedeiro é um processo complexo que, em muitos casos, envolve a participação de várias e distintas adesinas, as quais podem atuar ao mesmo tempo ou durante diferentes fases da infecção. Muitas bactérias patogênicas dispõem de fibras de polímeros designados por *pilus* ou fímbrias que facilitam a fixação inicial às células do epitélio (SALDAÑA et al, 2009).

2.3.1 fimH

O gene *fimH*, principal gene do grupamento *fim* (*fimF*, *fimG* e *fimH*), é um gene precursor de fímbrias do tipo 1. A expressão desta fímbria tem sido reportada por ser esta uma importante estrutura para formação do biofilme devido sua adesão celular inicial (WOOD et al, 2006). Enquanto a adesão mediada pela fímbria do tipo 1 é importante durante os estágios iniciais de colonização, a motilidade e quimiotaxia do

flagelo bacteriano permitem que a UPEC se dissemine para novos sítios do trato urinário, tanto para obter nutrientes quando estes se tornam limitados, quanto para escapar da resposta imune do hospedeiro (LANE et al, 2007).

2.3.2 iucD

A ExPEC se caracteriza por ser uma bactéria que tem o poder de se estabelecer em ambientes inóspitos. O gene *iucD* é responsável pela formação da aerobactina. A produção de aerobactina está relacionada com o aumento da capacidade de captação de ferro, necessário para o transporte de oxigênio bacteriano, síntese de DNA, transporte de elétrons e metabolismo de peróxidos (JOHNSON, 1991).

A produção de aerobactina é detectada em grande frequência em amostras de *E. coli* provenientes da urina e do sangue, mais do que em isolados fecais de indivíduos normais, mostrando que a produção da aerobactina tem um importante papel no fator de virulência em isolados da *E. coli* extra-intestinal (OPAL et al, 1990).

2.3.3 pap

As bactérias patogênicas frequentemente possuem pili com propriedades de ligação específicas que lhes permitem anexar ao tecido epitelial. Na *E. coli*, o pili associado a pielonefrite se liga no glicolípido do epitélio do trato urinário, favorecendo, assim a sua adesão e conseqüente infecção.

A fímbria P é um heteropolímero constituído de 1000 subunidades helicoidais polimerizadas, com uma subunidade maior (Pap A) constituindo o corpo da fímbria e três subunidades menores (Pap E, Pap F e Pap G) que estão relacionadas à aderência; Pap H é responsável pela terminação e implantação da fímbria na superfície celular. Pap C e Pap D são requeridas para polimerização e transporte das subunidades fimbriais, respectivamente. Pap G é a molécula de adesina que confere

especificidade de ligações. Pap B e Pap I são proteínas envolvidas na ativação transcricional do operon (LUND et al., 1988).

2.3.3.1 papGII

Os produtos dos genes pap-G, de uma forma geral favorecem a sua fixação às células da bexiga urinária, trabalhos demonstram que para uma adesão eficiente ao rim do hospedeiro é essencial que a *E. coli* contenha esse gene, ou seja, o pili é o mais específico para uma adesão a este órgão (SODERHALL, 2005).

2.3.4 hlyF

Em 1999, Beutin et al., estudando cepas de STEC, observaram que cerca de 89% apresentavam um fenótipo hemolítico diferente do padrão já conhecido e associado à alfa-hemolisina de *E. coli* (Hly). As cepas foram denominadas enterohemolíticas e não produziam alfa-hemólise em ágar sangue de carneiro convencional, mas pequenas e turvas zonas hemolíticas, após a incubação por 18 a 24 horas em ágar sangue com hemácias de carneiro lavadas, suplementado com cloreto de cálcio. (BEUTIN et al, 1994). Embora a enterohemolisina esteja presente na maioria dos isolados de EHEC e STEC e a enterohemólise sugerida como um marcador para detecção de EHEC (BEUTIN et al., 2004), sua contribuição na patogenicidade de EHEC/STEC ainda não foi esclarecida. Sugeriu-se que a lise de eritrócitos pode fornecer ferro e estimular o crescimento de STEC (LAW, 1995).

2.3.5 usp

A proteína uropatogênica específica tem sido usada para identificar a presença de *Escherichia coli* uropatogênica tanto em humanos quanto em animais de estimação (DRESCHER, 2006). A presença do gene usp em isolados de *E. coli* de

cães e gatos tem proposto que estes animais são reservatórios para a ITU humana (WEBER et al, 2006).

2.3.6 *cnf1*

O Fator Citotóxico Necrosante (CNF, da sigla em inglês Cytotoxin Necrotizing Factor) é uma proteína que interage com outra proteína Rho ligada à GTP da célula epitelial, resultando em profundas mudanças no citoesqueleto dessas células, incluindo reorganização da actina e pregueamento da membrana. Existem dois tipos de CNF, o CNF1 e CNF2 que são imunologicamente relacionados e de tamanhos similares. O gene que codifica CNF1 está localizado no cromossomo, na Ilha de patogenicidade, enquanto o gene que codifica CNF2 encontra-se no plasmídio (PUENTE & FINLAY, 2001; HIRSH & ZEE, 2003).

2.3.7 *iss*

O gene *iss* foi descrito como seu papel na resistência ao soro associado com o plasmídio ColV em um isolado de *E. coli* humana, aumentando em 100 vezes a virulência de *E. coli* em pintos de um dia de idade. A eliminação deste plasmídio de cepas aviárias reduz a sua patogenicidade e a sua reintrodução na cepa por conjugação restabelece a mesma (BINNS, 1979).

Este gene é responsável pelo bloqueio do complexo terminal do sistema do complemento que atua na membrana celular causando a lise da célula. Portanto, ele confere à bactéria resistência ao complemento, que é um mecanismo de defesa do hospedeiro e que atua contra infecções, especialmente infecções bacterianas, pois é capaz de promover a opsonização e lise do agente infeccioso (BINNS et al., 1982).

O gene *iss* é um determinante genético que pode mediar a resistência da bactéria aos efeitos bactericidas do soro do hospedeiro. A expressão deste gene já foi observada aumentando em 20 vezes esta capacidade de resistência das células bacterianas aos efeitos do soro (CHUBA et al., 1986). Estudos genéticos sugerem

que o gene *iss* obtido de *E. coli* isolada de humanos é derivado do gene de bacteriófago lambda chamado "bor" (CHUBA et al., 1989; BARONDESS & BECKWITH, 1990).

2.3.8 tsh

O gene "tsh" codifica a proteína autotransportada hemaglutinina temperatura sensível (Tsh), que tem atividade hemaglutinante e proteolítica. O gene *tsh* é sintetizado como uma proteína precursora de 140 kDa, que é clivada, em um domínio passageiro de 106 kDa (Tshs) e um beta-domínio de 33 kDa (Tshb). PROVENCE e CURTISS (1994) relataram a ocorrência de atividade hemoaglutinante em amostras de *E. coli* que somente é expressa a temperaturas entre 26°C e 30°C e a chamaram de Hemaglutinina Temperatura Sensível e identificaram o primeiro gene (*tsh*).

2.3.9 afa

O gene "afa" é precursor das adesinas afimbriais, as quais estimulam a ligação de bactérias em diversos tipos de células hospedeiras (SERVIN, 2005; COTA et al, 2006). Estas adesinas são freqüentemente codificadas por estirpes de *E. coli* que aderem difusamente (DAEC), e são epidemiologicamente associadas com estirpes patogênicas causadoras de ITU crônicas e recorrentes, cistite em crianças e pielonefrite em gestantes (NOWICKI et al, 2001).

2.3.10 sfa

O gene *sfa* é codificador da adesina fímbria S, reconhecendo resíduos de ácido siálico na laminina. Esta fímbria é uma hemaglutinina manose-resistente que se liga a estruturas presentes em eritrócitos humanos, sendo usualmente detectada em

amostras de *E. coli* isoladas em pacientes com quadros clínicos de sépsis ou meningite (JOHNSON & KUSKOWSKI, 2000).

2.4 Caracterização molecular bacteriana

A descoberta de que os genomas procarióticos continham seqüências repetitivas de DNA expandiu as metodologias de biologia molecular para estudos de variabilidade clonal em muitas espécies bacterianas, incluindo *E. coli* (CHANSIRIPORNCHAI et al., 2001). Algumas técnicas moleculares de tipagem baseadas em PCR utilizam “primers” homólogos a essas seqüências que, após a amplificação geram um perfil específico para cada amostra bacteriana (VERSALOVIC et al., 1991).

Três famílias de seqüências repetitivas de DNA são estudadas mais detalhadamente em *E. coli* (CHANSIRIPORNCHAI et al., 2001). As “Seqüências Palindrômicas Extragênicas Repetitivas” (REP) que possuem um número de cópias que variam de 500 a 1000 em *E. coli*, as “Seqüências Consensuais Intergênicas Repetitivas Enterobacterianas” (ERIC), entre 30 e 50 cópias em *E. coli* e o “Elemento BOX” (BOX), cujo número de cópias é semelhante ao observado nas seqüências ERIC de *E. coli* (MARTIN et al., 1992).

O número de cópias de seqüências ERIC varia com a espécie. Em *E. coli*, alguns autores estimam esse número em 30 cópias (DUCHAD et al., 2003), enquanto que outros relatam números variando de 30 a 50 (MARTIN et al., 1992). As seqüências ERIC diferenciam-se de outras seqüências repetitivas presentes em variadas espécies e foram primeiramente descritas em *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* e demais membros da família Enterobacteriaceae. Estão presentes apenas em regiões intergênicas, dentro de regiões transcritas (HULTON et al., 1991).

A seqüência do ERIC contém 126 pares de bases altamente conservados que se repetem no genoma de *E. coli*. A estratégia utilizando ERIC-PCR pode discriminar

linhagens em nível de subespécies devido à ampla distribuição desses elementos no genoma de vários membros das enterobactérias (JOHNSON & RUSSO, 2005).

Segundo SILVEIRA et al. (2002), PFGE e RFLP estão entre as melhores técnicas de caracterização molecular, por apresentarem grande capacidade de diferenciação entre as amostras bacterianas analisadas, sendo também as metodologias mais usadas. Porém, exigem DNA em grande quantidade, são demoradas, requerem equipamentos caros e mão-de-obra especializada.

Métodos de tipagem têm sido relatados como metodologias bastante consistentes para caracterizar cepas de *E. coli* de origem fecal no que se refere à fonte destas bactérias (GUAN et al., 2002). MOHAPATRA et al. (2007), objetivando diferenciar *E. coli* isoladas de fezes humanas, de animais domésticos e selvagens, que contaminavam as águas de quatro lagos em British Columbia, Canadá, utilizaram técnicas ERIC e BOX-PCR para realizar a caracterização molecular destes isolados.

A identificação de relação epidemiológica para as linhagens ExPEC pode identificar características específicas que, por sua vez, podem explicar a patogenia das doenças extraintestinais. A possibilidade de diferenciar organismos ExPEC é bastante recente e pode auxiliar na definição de estratégias para controlar ou até mesmo evitar as ITUs (RILEY, 2004).

2.5 Resistência Antimicrobiana

A resistência aos antibióticos representa um problema clínico e socioeconômico mundial. Em mais de meio século de uso generalizado levaram à diminuição da sua eficácia e ao aparecimento de estirpes bacterianas que desenvolveram mecanismos de resistência (LINDSAY et al, 2006).

A resistência pode ser natural, aparecendo ao acaso ou adquirida. A segunda envolve alterações genéticas nos microrganismos (mutações espontâneas) ou aquisição de genes exógenos por mecanismos de transdução, conjugação, transformação de elementos de DNA móveis (plasmídeos, integrons e transposons),

que transportam genes de resistência para microrganismos sensíveis. Os principais mecanismos de resistência incluem a diminuição da concentração intracelular por mutações nas purinas; o aumento do efluxo; a inativação ou alteração do local de ação por mutações nas proteínas de ligação; a hidrólise do antibiótico através de enzimas bacterianas e modificação do mesmo (NORMARK, 2002).

Um dos grandes desafios na prática da medicina e cirurgia veterinária é a dificuldade no controle de infecções secundárias. O controle das infecções por *Escherichia coli* na medicina veterinária tem sido um problema devido à sua resistência múltipla aos antibióticos. Isto é preocupante devido ao contato cada vez mais próximo com animais de companhia (NOLAN *et al.*, 1987). Os pesquisadores WHITE *et al.*, demonstraram que em 2002 o nível de resistência antimicrobiana em cepas patogênicas vem aumentando com o passar do tempo. Os microrganismos Gram-negativos se mostraram resistentes com índices próximos a 75% para alguns antimicrobianos testados, como amoxicilina, ciprofloxacino, norfloxacino, entre outros (POLETTO & REIS, 2005). As bactérias identificadas por Jancel e Dudas em 2002 se mostraram resistentes em maior índice a amoxicilina e ampicilina, 74,6% e 72,7% respectivamente. Mesmo apresentando uma alta concentração urinária, estes antimicrobianos não são recomendados para tratamento das ITUs por causa da resistência e alta recorrência, se comparados a outros agentes. Da mesma forma a elevada resistência microbiana ao trimetoprim/sulfametoxazol é justificada pelo fato de ser um antimicrobiano mais antigo, já muito utilizado em infecções, possivelmente de uma maneira indiscriminada e aleatória com a automedicação (MARTINO *et al.*, 2002)

Alguns estudos mostram que a terapia empírica inapropriada pode levar ao uso desnecessário de antimicrobianos. A criação de um sistema de monitoramento da resistência bacteriana é um importante passo na detecção da resistência, ajudando na seleção da terapia empírica local mais eficaz e permitindo implementar medidas de prevenção (BAIL, 2006).

As cepas de *E. coli* são freqüentemente identificadas através de reações bioquímicas. Contudo, esse método deve ser usado com cautela, porque apenas

90% das cepas de *E. coli* são lactose-positiva; algumas cepas de *E. coli* diarréicas, incluindo muitas cepas de *E. coli* enteroinvasivas, são lactose-negativa. O teste do indol, positivo em 99% das cepas de *E. coli*, é o melhor teste para identificação dos outros membros da família *Enterobacteriaceae* (TRABULSI *et al.*, 2002).

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Isolar e identificar cepas de *E. coli* de mulheres com ITU a partir de uma amostra de urina enviada ao laboratório municipal de Ituverava-SP.
- Isolar e identificar cepas de *E. coli* dos animais de estimação das mulheres que apresentavam ITU.
- Realizar teste para detecção de genes de virulência (PCR), nos isolados de origem humana e nos de origem animal.
- Testar a semelhança genética entre os isolados de origem humana e animal.
- Realizar teste de susceptibilidade a antimicrobianos nos isolados de origem humana e animal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta

Foram abordados 470 pacientes, homens e mulheres, que deram entrada com pedido de urinálise no laboratório municipal de Ituverava-SP. Destes, apenas 213 tinham em suas respectivas solicitações pedidos de urocultura como exame complementar, que destes 167 concordaram em participar da pesquisa após expostas as finalidades desta. Após a realização dos exames constatou-se que

apenas 85 eram do sexo feminino e apresentavam ITU, que destes 63 era pela bactéria *Escherichia coli*. Em 28 casos as pacientes tinham cão ou gato como animal de estimação, mas quando feita a tentativa de contato, muitas destas pacientes havia fornecido endereço falso, haviam se mudado ou simplesmente não foram encontradas restando apenas 7 mulheres que preenchiam todos os critérios de inclusão na pesquisa.

O material coletado em condições de assepsia foi centrifugado a 2000 RPM por 5 minutos e semeado em placas contendo meio Mac Conkey para isolamento bacteriano. Cada uma destas sete amostras, tanto animais como humanas, foram repicadas em dez isolados diferentes, para assim serem, novamente identificadas e submetidos aos testes de identificação, resistência antimicrobiana, PCR e ERIC-PCR, e de um total de 140 isolados, sendo 70 de origem animal e 70 humana restaram, por fim, 59 isolados de origem humana e 51 de origem animal.

As amostras humanas utilizadas foram cedidas pelo laboratório Municipal de Ituverava, em placas contendo meios MacConkey utilizados para avaliação laboratorial, sem necessitar de novas coletas pelo paciente. Para as amostras de origem animal foram feitos os contatos e quando autorizada a coleta foi realizada na residência do paciente. Os animais foram avaliados clinicamente e não apresentaram alterações.

As amostras fecais dos animais de estimação, cães e gato, foram coletadas por meio de swabs estéreis na região anal do animal. O material foi esgotado em placas de Petri em placas contendo meio Mac Conkey para isolamento bacteriano.

Para a utilização das amostras, seja as de origem animal, seja de origem humana, foi apresentado um termo de entendimento e concordância na utilização das amostras para fins de pesquisa para os indivíduos que deram entrada com o pedido do exame, sem que haja em nenhum momento interesse financeiro. Os indivíduos que concordaram, não receberam nenhum tipo de benefício financeiro e assinaram o termo apresentado. (anexos 01, 02 e 03)

4.2 Isolamento e identificação

As amostras foram esgotadas em meio de crescimento específico tipo MacConkey e incubadas a 37° C por 24 horas. Para sua identificação foram realizados os testes bioquímicos confirmatórios (Indol, Carboidratos, Lisina, Motilidade, Urease, H₂S e Citrato de Simons) e posteriormente foram utilizados os demais testes (PCR e antibiograma).

Para verificar a fermentação dos carboidratos, testar a lisina, a motilidade e o H₂S, as amostras foram semeadas com o auxílio de uma agulha de platina de semeadura em meio Tríplice de açúcar de Ferro (TSI), pela técnica de picada e incubadas à 37° C por 24 horas (KONEMAN *et al.*, 1997).

Para testar o indol, os microrganismos foram inoculados com o auxílio de uma agulha de semeadura em tubos de ensaio contendo o caldo triptofano, e incubado a 37°C por 24 horas. Ao término deste período foram adicionadas 15 gotas do reativo de Kovacs pela parede do tubo. O desenvolvimento de uma cor vermelho fúcsia brilhante na superfície de contato entre o reativo e o caldo triptofano indica a presença de indol.

O meio contendo citrato de Simons é vertido em tubo com ágar inclinado. Fazem-se estrias sobre a superfície inclinada do ágar, com um inóculo escasso. A produção de uma cor azul no meio, após 24 horas de incubação a 37°C, indica a presença de produtos alcalinos e uma prova de utilização de citratase positiva, excluindo a possibilidade de ser *E. coli*. O teste da uréia foi feito a partir de tubo inclinado, semeando o inóculo na superfície do meio, após 24 horas de incubação a 37°C, indica a presença de urease com a mudança de cor rosa para vermelha na superfície do ágar (EDWARDS & EWING, 1972).

4.3 Preparação do DNA Bacteriano para Amplificação

O DNA a ser amplificado foi liberado do microrganismo por lise térmica. A bactéria foi inoculada em Luria Broth sem glicose (10 g tripitona + 5 g extrato de levedura + 5g de NaCl por litro, pH 7,0) por 18 horas a 37°C. A bactéria foi coletada a

partir de 1 ml de uma cultura de Luria Broth que cresceu durante 18 horas. Após centrifugação (12.000 rpm por 30 segundos) o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado em 200 µl de água Milli Q autoclavada. A centrifugação e ressuspensão foram novamente realizadas e por último o precipitado foi ressuspensionado em 200 µl de água Milli Q. O tubo foi incubado por 10 minutos a 100°C, para que ocorra a quebra da parede celular. Após a centrifugação do lisado (12.000 rpm por 10 segundos), 150 µl do sobrenadante foi estocado a -20°C como estoque de DNA molde (DNA Template)(KESKIMAKI et al, 2001).

4.4 Procedimento da PCR para a detecção dos genes

A reação de PCR multiplex foi realizada empregando os seguintes parâmetros: uma alíquota de DNA (4µL) foi acrescentada à mistura contendo 0,4µL de dNTP (2 mM), 3,6µL de solução tampão 10X (100 mM Tris-HCl [pH 8.8] 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 0,8µL de cada primer (40 mM) e 0,2µL Taq DNA polimerase, obtendo um volume total de 20 µL completado com água MiliQ. Os ciclos de amplificação foram feitos em um termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient nas seguintes condições: t1, 5 min a 94°C; t2, 30 seg a 94°C; t3, 45 seg a 50°C; t4 1 min a 72°C (t2-t4, 25 ciclos repetidos) e t5 7 min a 72°C.

O produto da reação acrescentado de 5µL de carga de tintura (0,25% azul de bromofenol em 50% de glicerol) e o marcador molecular de 100 pb foram aplicados em um gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (1µg/mL) em tampão TEB e separados por eletroforese (70V/1h40). O produto de amplificação foi visualizado por exposição do gel em luz UV.

Foram utilizados três jogos de primers sintetizados pela Invitrogen, cada um dos jogos de primers foi utilizado para amplificação de um dos três operons fímbriais estudados, *pap*, *afa*, *sfa*. O PCR foi realizado em um volume de 50 µl contendo 10 µl do DNA template, 0,5µM de cada um dos primers, 200 µM de cada um dos quatro deoxinucleotídeo trifosfato, 10 mM Tris HCl (pH 8,3) 1,5 M Mg Cl 2 e 2U de Taq

polimerase (Biotol). A amplificação por PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação de 94 °C por 5 minutos seguido por 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, anelamento a 65 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2 minutos e um ciclo final de extensão a 72 °C por 10 minutos. Segundo o protocolo estabelecido por LE BOUGUENEC et al (1992).

Após um dos dois processos de amplificação 10µl da mistura de amplificação foram analisados por eletroforese em um gel de agarose de 1,5%, e os produtos da reação foram visualizados após marcação com brometo de etídeo. Um controle da reação (branco) o qual continha todos os componentes da mistura de reação exceto o DNA molde foi incluído em cada reação de PCR.

Tabela 01. PCR multiplex: combinação de primers para detecção de genes de virulência, temperatura de anelamento e tamanho dos ensaios amplificados realizados em dois conjuntos.

Conjunto	Genes	TA (°C)	Tamanho (pb)	Referência
1°	<i>fim</i> H	50	465	Siqueira et al, 2009
	<i>iuc</i> D	50	714	Siqueira et al, 2009
	<i>hly</i> F	50	450	Johnson et al, 2008
	<i>USP</i>	50	1000	Siqueira et al, 2009
	<i>cnf</i> 1	50	633	Matsuda et al, 2010
	<i>ISS</i>	50	309	Johnson et al, 2008
	<i>Tsh</i>	50	824	Maurer et al, 1998
	<i>pap</i> GII	50	562	Siqueira et al, 2009
2°	<i>Pap</i>	65	336	Le Bouguenec et al, 1992
	<i>AFA</i>	65	750	Le Bouguenec et al, 1992
	<i>Sfa</i>	65	410	Le Bouguenec et al, 1992

TA- temperatura de anelamento

4.5 Pesquisa de semelhanças genéticas nas *E. coli* de origem humana e animal

Para a pesquisa de similaridades entre os isolados bacterianos humanos e de seus respectivos animais de estimação a fim de demonstrar possíveis transmissões

de bactéria foi realizada pela técnica de ERIC-PCR, a partir do material genético obtido pela lise térmica das *E. coli* (DNA template).

Os elementos ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) foram descobertos em regiões intergênicas do genoma de eurobactéria, são caracterizadas como pequenas unidades repetitivas de 127 pares de bases contendo região central altamente conservada com repetições invertidas de 40 pares de bases. A técnica tem sido amplamente utilizada em estudos de genética e evolução de microrganismos por ter reprodutibilidade e rapidez. A técnica de ERIC-PCR foi realizada em conformidade com o proposto por VERSALOVIC et al. (1991).

Os isolados de *E. coli* foram submetidos a reações ERIC-PCR com primers ERIC1 (5_-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3_) e ERIC2 (5_AGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3_) (VERSALOVIC et al.,1991). Cada reação ERIC-PCR foi realizada em um volume total de 20 µL com os seguintes componentes: 4 µL do DNA template, 2 µL (10 pM) de ambos os primers, 1 µL de uma mistura dNTP (10 mM cada), 4 µL de solução tampão, 3 µL de 25 mM MgCl₂ e uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, Europe). O perfil térmico da amplificação do PCR foi baseada em um estudo realizado por Silveira et al. em 2002, com pequenas adaptações como desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; seguidos por 30 ciclos de desnaturação (94 °C, 30 s), anelamento (52 °C, 45 s) e extensão (72 °C, 1 min) com um passo final de extensão (72 °C, 7min). Dez microlitros de cada reação foram então analisadas por um gel de eletroforese contendo 1.5 % de brometo de etídio. Os resultados obtidos foram avaliados por observação das diferenças entre as bandas formadas nos seus respectivos géis de eletroforese entre os pesquisados.

4.6 Resistência Antimicrobiana

Para a realização do teste de sensibilidade aos antibióticos, as cepas de *E. coli* foram repicadas em meio Luria Bertani para a obtenção de colônias recém formadas (um dia de incubação). Após a incubação, as bactérias foram repicadas em 2mL de infusão cérebro-coração (BHI) e colocadas em estufa a 37° C até obter na escala de

H3-2	+										
H3-5	+										+
H3-7	+										
H3-8	+										
H3-9	+										
H3-4	+										
H3-3	+										
H3-6	+										
C3-6	+			+			+				
C3-8	+										
C3-9	+										
C3-1	+						+				
C3-3	+										
C3-2	+					+					
C3-4	+										
C3-5	+			+							
C3-10	+										
C3-7	+			+			+				
H5-2	+			+			+				
H5-8	+			+			+				
H5-4	+			+			+				
H5-6	+			+			+				
H5-3	+			+			+				
H5-1	+			+			+				
H5-10	+			+			+				
G5-6	+										+
G5-7	+										+
G5-8	+										+
G5-9	+										+
G5-4	+										
G5-1	+										
G5-2	+										
G5-3	+										
G5-5	+										
G5-10	+										
H14-1	+			+			+				
H14-2	+			+			+				
H14-3	+			+			+				
H14-4	+			+			+				
H14-9	+			+			+				
H14-8	+			+			+				
H14-5	+			+			+				
H14-6	+			+			+				+

C33-7	+										
C33-1	+										
C33-4	+										
C33-6	+			+							
H34-10	+										
H34-1	+										
H34-6	+										
H34-9	+										
H34-7	+										
H34-4	+										
H34-2	+										
H34-3	+										
H34-5	+										
H34-8	+										
C34-2	+	+								+	
C34-10		+							+		
C34-8		+							+		
C34-4	+	+	+	+			+		+		
C34-6	+	+	+	+			+		+		
C34-5	+		+	+							
C34-9	+	+				+			+	+	
C34-1	+										
C34-3	+										
C34-7	+										

*As letras H, C e G indicam a origem humana, cães e gatos, respectivamente, seguidos por número da amostra e em seguida do isolado.

Dos genes encontrados o que mais se destacou foi o fimH, estando presente em todos os isolados pesquisados de origem humana e em 96,07% entre os isolados de origem animal. Outros achados importantes são 44,06% e 13,72% do gene hlyF e 42,37% e 11,76% do gene iss nos isolados de origem humana e animal, respectivamente. (Figura 01)

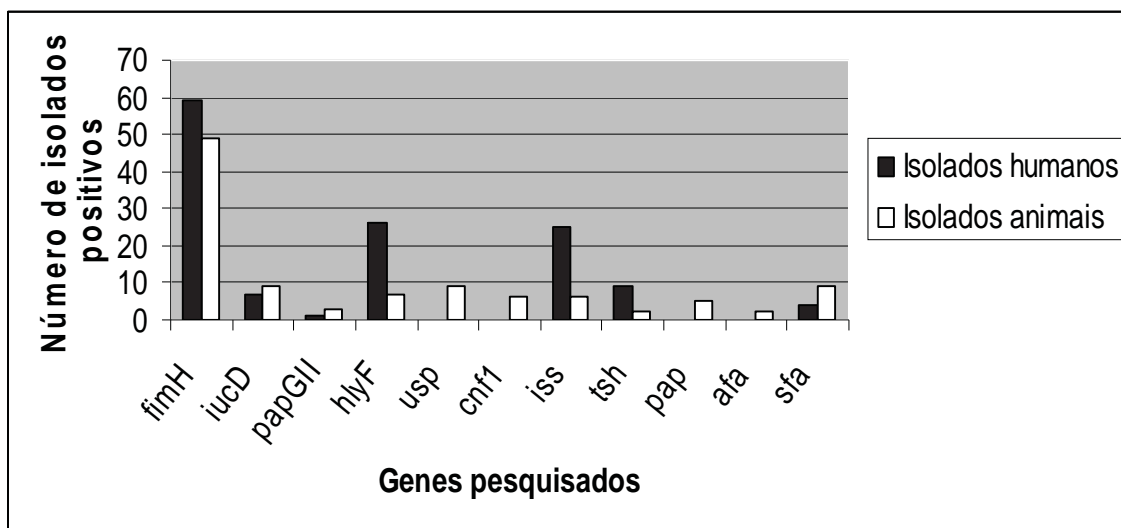


Figura 01- Prevalência de genes de virulência de um total de 59 isolados de *Escherichia coli* de origem de infecção do trato urinário humana e 51 fecais de seus respectivos animais de estimação.

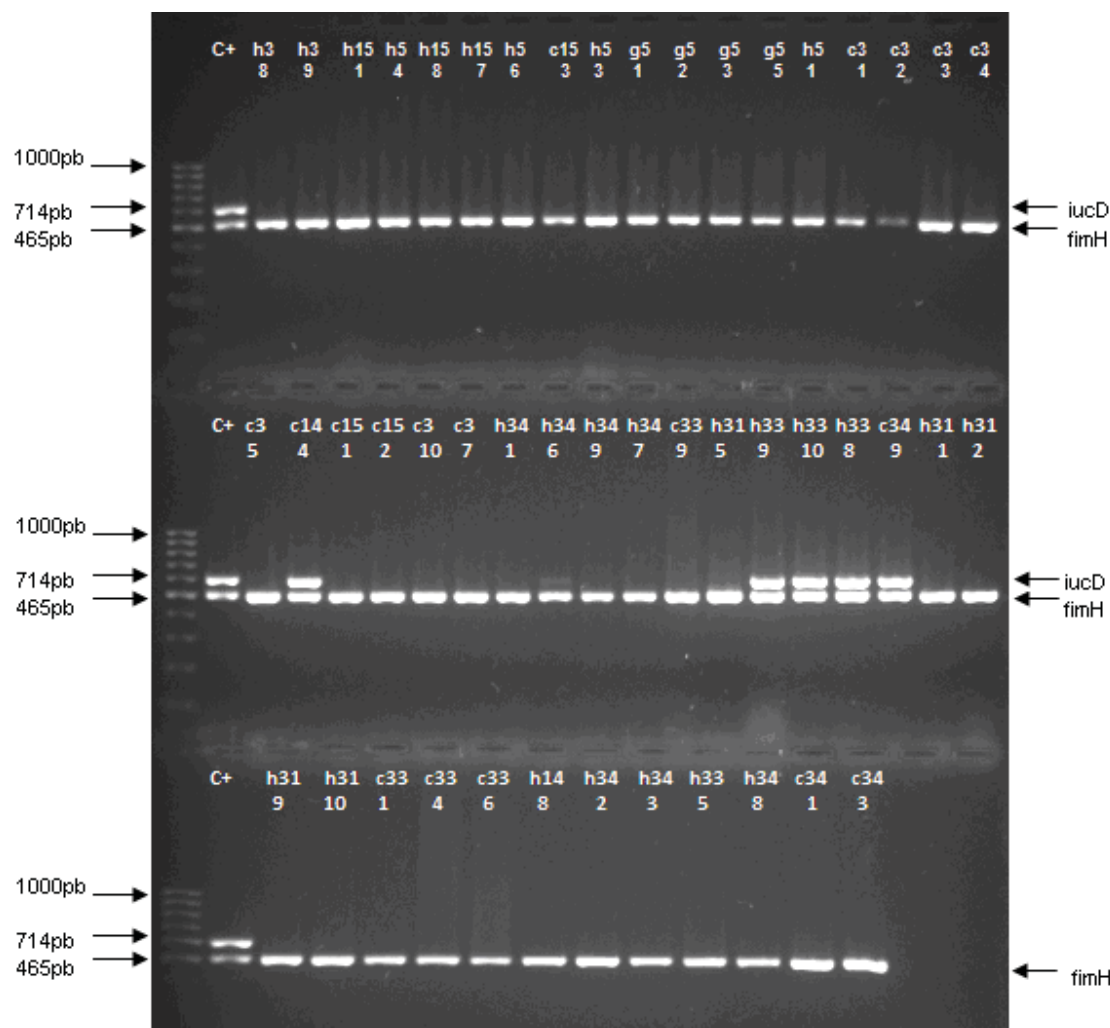


Figura 02- Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado a esquerda. Canaleta 1: marcador de peso molecular λ X174 RFDNA – digestão com Hae III; Canaleta 2: controle positivo iucD + e fimH +; Demais canaletas isolados fimH positivos e isolados C14.4, H33.9, H33.10, H33.8 e C34.9 iucD + e fimH +.

A tabela 03 elucida as diferentes porcentagens dos genes precursores de virulência, evidenciando diferenças genéticas entre as *E. coli* das diferentes origens. Vale ressaltar que todos os genes testados foram encontrados nos isolados de origem animal, porém quando encontrados nos isolados humanos, há uma grande diferença entre as porcentagens encontradas.

Tabela 03. Prevalência de genes codificadores de fatores de virulência determinados por PCR em isolados de *E. coli* de humanos com ITU (n= 59) e das fezes de seus animais de estimação (n=51)

Origem	% de fatores de virulência - isolados positivos										
	fimH	iuc	papGII	hly	usp	cnf	ISS	tsh	pap	afa	Sfa
Animal	96.0	17.6	5.8	13.7	17.6	11.7	11.7	3.9	9.8	3.9	17.6
Humana	100.0	11.8	1.6	44.0	0	0	42.3	15.2	0	0	6.7

Vários isolados apresentavam diferentes padrões de virulência, sendo mais evidente quando se compara entre humanos e animais. A Tabela 04 ilustra que isolados com padrões idênticos, na maioria das vezes se trata da mesma espécie, ou seja, padrões semelhantes entre as espécies e dissimilaridades, quando comparadas as duas origens bacterianas.

Tabela 04. Padrões de virulência de *Escherichia coli* isolados de mulheres com infecção do trato urinário e seus respectivos animais de companhia (fezes).

Número de Isolados		Genes									
Animal	Humano	iucD	papGII	hlyF	usp	cnf1	Iss	tsh	pap	afa	sfa
4	3										+
1	2			+							
2		+									
1								+			
1							+				
3	15			+			+				
1					+						
	1			+			+				+
2					+	+					
1						+					+
1		+								+	
2		+							+		
1			+	+							
1					+			+			+
1		+			+						+
2				+	+						+
	6	+		+			+	+			
	1			+			+	+			
2		+	+	+			+		+		
1		+			+				+	+	

*Gene fimH não demonstrado. Isolados humanos que apresentam somente fimH n = 31

5.2 Pesquisa de cepas semelhantes

A pesquisa de cepas semelhantes foi realizada pelo método de ERIC-PCR, os resultados demonstraram dissimilaridades entre os grupos estudados. Os isolados foram escolhidos a partir da presença de determinados genes pesquisados por PCR para que se pudesse direcionar mais a pesquisa. A amostra de número três revelou as possíveis semelhanças genéticas da *E. coli* entre uma mulher com ITU e seu respectivo cão de estimação, que conforme está sendo apresentado na figura 03 há semelhança entre as bandas formadas, porém está presente também formações de bandas não coincidentes, indicadas pela seta. Tal fato indica aparente semelhança, mas não indica a similaridade.

De acordo com as figuras 03 e 04 as amostras de número 33 e 34 não revelaram nenhum tipo de semelhanças genéticas por apresentarem padrões de bandas totalmente diferentes entre as espécies humana e animal.

Vale ressaltar que todas as amostras testadas foram oriundas de urina de mulher com ITU e de material de origem fecal de seus respectivos animais de estimação, e que ainda, todas as pacientes mantêm um contato com estes animais de forma bastante intensiva, o que poderia evidenciar transmissão, porém um estudo temporal em cada par deve ser realizado para, assim, confirmar tal dissimilaridade.

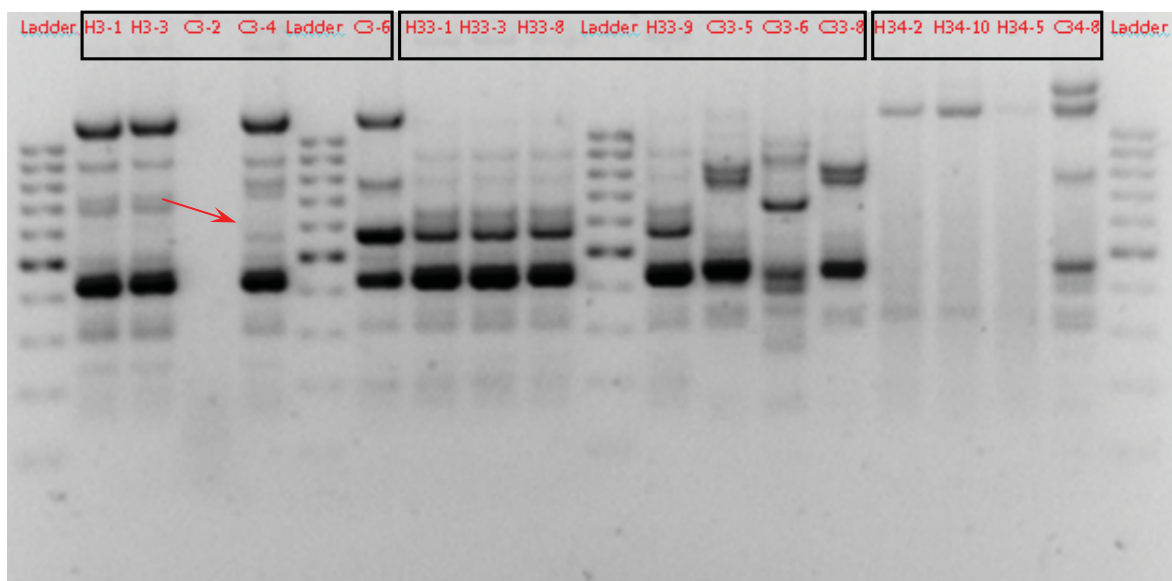


Figura 03- Gel de eletroforese de ERIC-PCR, onde ladder é um padrão de corrida, seguidos pelos isolados de origem humana e animal com enquadramento de cada par testado. A seta evidencia ponto de dissimilaridade. Foto com inversão de fundo para melhor visualização.

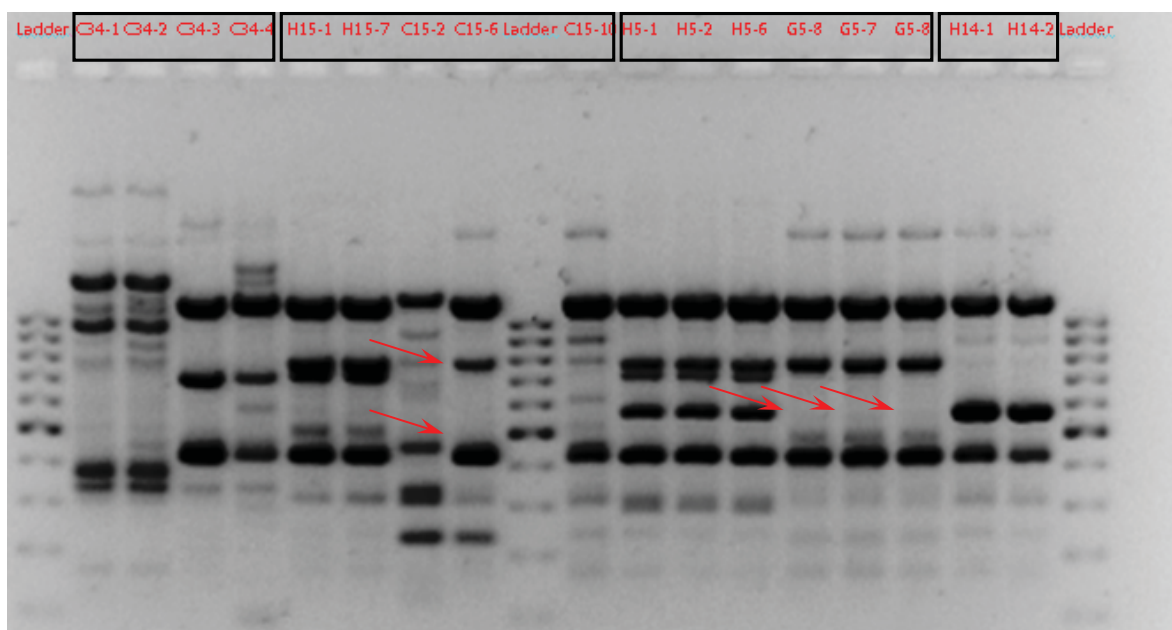


Figura 04- Gel de eletroforese de ERIC-PCR, onde ladder é um padrão de corrida, seguidos pelos isolados de origem humana e animal com enquadramento de cada par testado. As setas evidenciam ponto de dissimilaridade. Foto com inversão de fundo para melhor visualização.

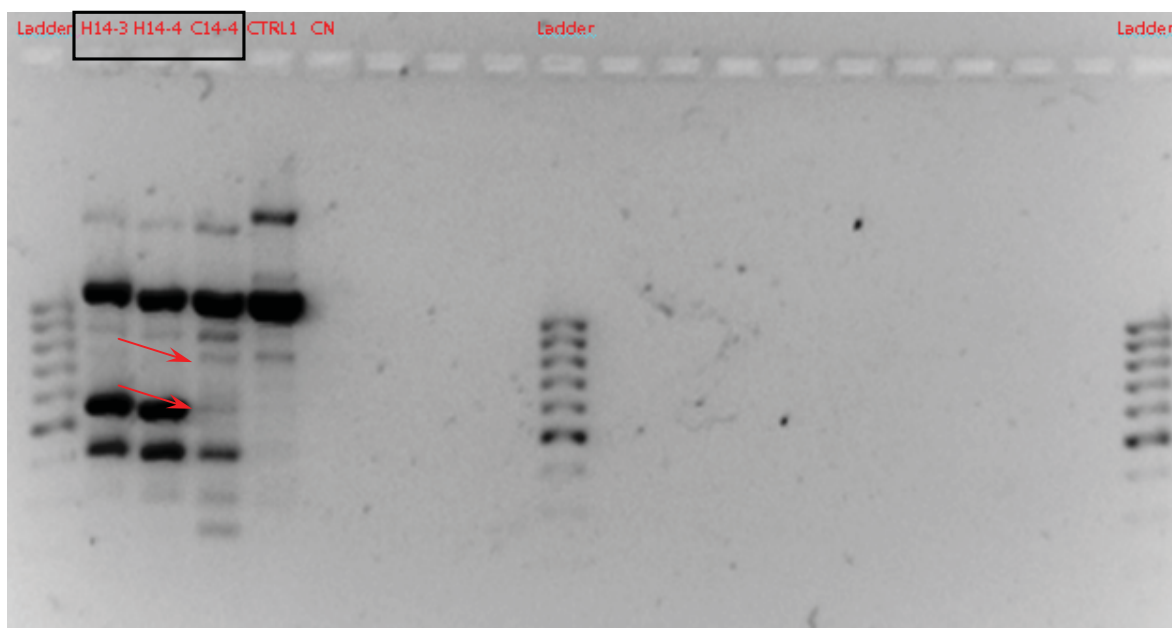


Figura 05- Gel de eletroforese de ERIC-PCR, onde ladder é um padrão de corrida, seguidos pelos isolados de origem humana e animal com enquadramento de cada par testado. As setas evidenciam ponto de dissimilaridade. Foto com inversão de fundo para melhor visualização.

5.3 Resistência a antimicrobianos

Cada amostra inicial foi semeada pela técnica de esgotamento a fim de se obter dez isolados. De forma aleatória foram selecionados 5 isolados de cada amostra e submetido aos testes de resistência a antimicrobianos.

As amostras de origem humana apresentaram de uma forma geral maior número de cepas resistentes aos antimicrobianos testados, com exceção de amoxicilina/ácido clavulânico, que apresentou 18 das 35 cepas resistentes, enquanto as cepas dos seus respectivos animais de estimação apresentou 26 das 35 cepas resistentes. Para a ampicilina e para a cefalotina a porcentagem de cepas resistentes foi a mesma para ambas as espécies: 68,57% e 62,85%, respectivamente. Todos os demais antimicrobianos testados apresentaram maior

resistência frente às cepas de origem humana. Para o ácido nalidíxico e o ciprofloxacino as cepas de origem humana apresentaram a maior resistência, 34 das 35 testadas (97,14%), e para as cepas de origem animal a resistência ao ciprofloxacino foi de 11,42%. A figura de número 06 ilustra a maior resistência frente aos antimicrobianos testados para as cepas de origem humana, com relação às de origem animal.

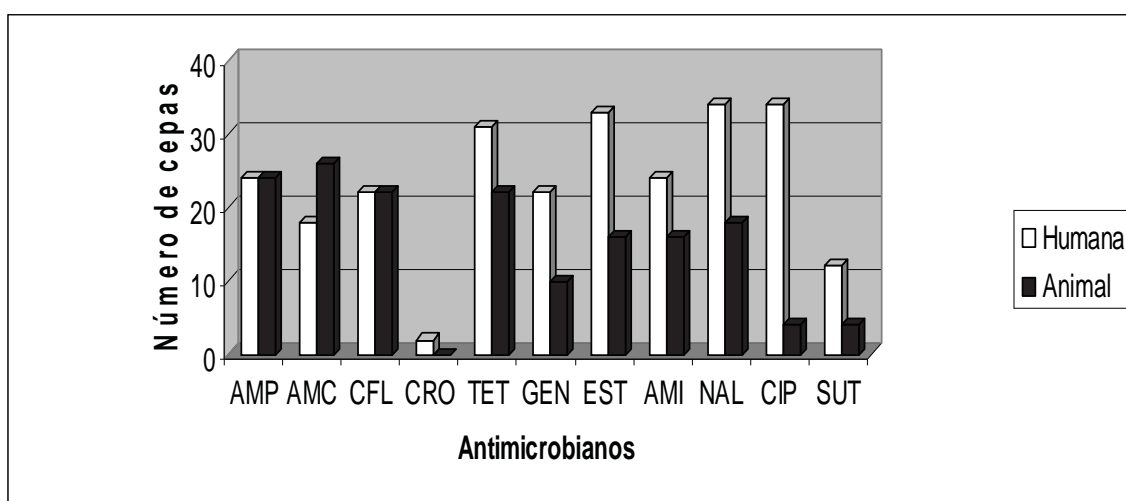


Figura 06. Susceptibilidade antimicrobiana de 59 e 51 isolados de *Escherichia coli* de origem humana e animal, respectivamente em Ituverava, SP, BR.

Foi avaliada cada cepa isoladamente para a avaliação da multirresistência e, assim, verificados a quantos antimicrobianos cada uma delas apresentava resistência. A multirresistência é considerada presente quando a cepa se apresenta resistente a, pelo menos, três antimicrobianos diferentes.

No presente trabalho pode-se observar que 25 dos 35 isolados (71,42%) apresentavam tal característica, sendo que um isolado se apresentou resistente a oito antimicrobianos e um a nove (Figura- 07).

Dentre os isolados de origem animal tal característica também esteve presente, porém em menores números. Dos 35 isolados testados 14 apresentaram tal característica, porém nenhum isolado com resistência a mais de sete antimicrobianos (Figura- 07).

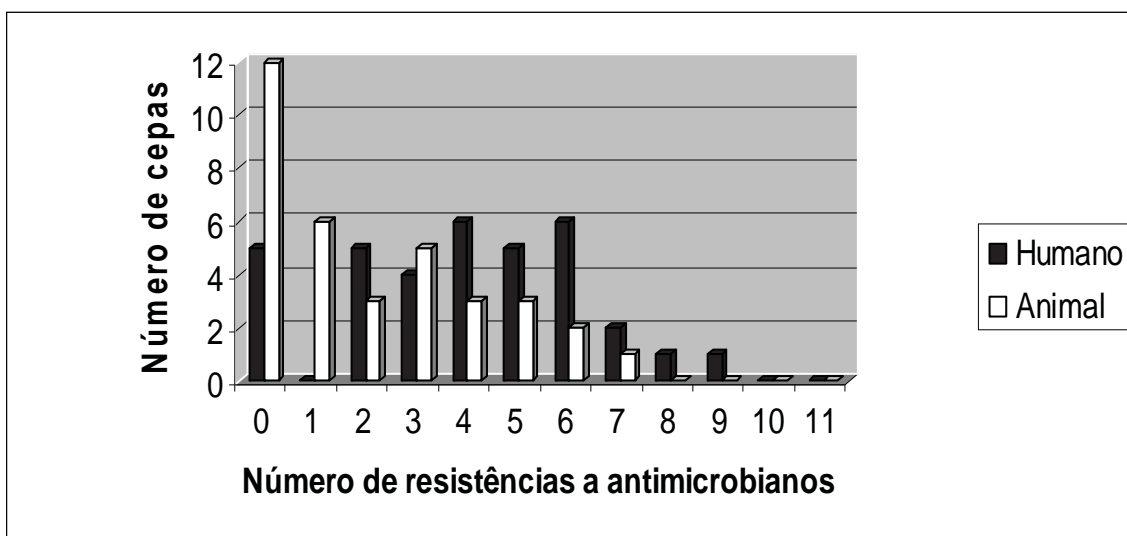


Figura 07- Distribuição da multiresistência para 11 agentes antimicrobianos entre os 59 e 51 isolados de *E. coli* de humanos e animais, respectivamente, na cidade de Ituverava, SP, Brasil.

Foi criada uma tabela (Tabela 05) para melhor visualização da possibilidade de existência de correlação entre o número de genes de virulência e os padrões de resistência antimicrobiana e, ainda, presença de fenótipos de resistências semelhantes entre a *E. coli* de origem humana e animal. Pode-se constatar que não existe correlação entre a quantidade de genes e seus padrões fenotípicos de resistência. Constatou-se ainda, que tal diferença entre os padrões de resistência estão também presentes entre cada par estudado.

Tabela 05 – Caracterização da presença de determinantes de virulência, expressos na quantidade de genes e da presença dos fenótipos de resistência dos isolados de ITU humana e fezes dos animais de companhia na cidade de Ituverava, SP, Brasil.

	Número de genes	Fenótipos de Resistências
H3-1	2	TET, EST, AMI, CIP
H3-5	2	CFL
C3-6	3	Nenhuma Resistência
C3-1	2	AMP, AMC, CFL, TET, NAL
C3-2	2	AMP, AMC, TET, SUT
C3-5	2	AMP, AMC, TET
C3-7	3	AMP, AMC, CFL, TET, GEN, EST, AMI

H5-2	3	Não Testada
H5-8	3	AMP, TET, EST, NAL, CIP, SUT
H5-4	3	AMP, AMC, CFL, TET, EST, NAL, CIP, SUT
H5-6	3	AMP, AMC, CFL, TET, EST, AMI, NAL, CIP, SUT
H5-3	3	Não Testada
H5-1	3	AMP, TET, EST, NAL, CIP, SUT
H5-10	3	AMP, TET, EST, NAL, CIP, SUT
G5-6	2	AMP, AMC, CFL, TET, EST, AMI
G5-7	2	Nenhuma Resistência
G5-8	2	AMP, AMI, NAL
G5-9	2	Nenhuma Resistência
H14-1	3	TET, GEN, EST, NAL, CIP
H14-2	3	Não Testada
H14-3	3	AMC, CFL, TET, EST, AMI, NAL, CIP
H14-4	3	TET, GEN, EST, AMI, NAL, CIP
H14-9	3	Não Testada
H14-8	3	Não Testada
H14-5	3	TET, GEN, EST, NAL, CIP
H14-6	4	TET, EST, NAL, CIP
H14-7	2	Não Testada
C14-4	2	TET
H15-7	2	AMC, NAL, CIP
C15-6	4	Não Testada
C15-10	4	Nenhuma Resistência
C15-5	4	Não Testada
C15-7	3	Nenhuma Resistência
C15-9	3	Nenhuma Resistência
C15-4	4	Nenhuma Resistência
C15-3	2	AMC
C15-2	3	Não Testada
C15-1	4	Não Testada
H33-3	5	Nenhuma Resistência
H33-5	5	Nenhuma Resistência
H33-4	5	AMC, CFL, GEN, AMI
H33-7	5	Não Testada
H33-2	5	AMC, CFL, TET, GEN, AMI, CIP
H33-6	2	Não Testada
H33-1	4	AMP, TET, GEN,
H33-9	5	Não Testada
H33-10	5	Não Testada
H33-8	6	Não Testada
C33-5	2	AMP, AMC, CFL, AMI, NAL
C33-6	2	AMP, AMC, CFL, NAL

C34-2	3	EST
C34-10	3	CFL
C34-8	2	TET, AMI
C34-4	6	AMP, TET, GEN
C34-6	6	Não Testada
C34-5	3	CFL, EST
C34-9	5	Não Testada

* não estão expressos os demais isolados por apresentarem apenas o gene fimH.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi possível observar que as cepas de *E. coli* estudadas apresentavam vários genes precursores de fatores de virulência, destes podemos destacar o fimH, hlyF e iss com 100%, 44,06% e 42,37% entre os isolados de origem humana e com menor frequência tsh, iucD, sfa e papGII, com 15,25%, 11,86%, 6,77% e 1,70% respectivamente. Os demais genes testados não foram encontrados em nenhum isolado de origem humana.

Entre os isolados de origem animal os genes mais encontrados foram: fimH, iucD, usp, sfa e hlyF com 96,07%, 17,64%, 17,64%, 17,64% e 13,72% respectivamente. Todos os demais genes testados apresentavam menores valores, porém no caso dos isolados de origem animal, todos os genes estavam presentes em pelo menos 4% dos isolados.

Em outro trabalho, com resultados que corroboram com o presente estudo, YURI *et al.* (1998) verificaram 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 hígidos. Segundo os autores estes fatores de virulência também são encontrados em estirpes isoladas de humanos, e as linhagens isoladas de humanos e cães com UTI possuem maior

quantidade de fatores de virulência do que aquelas encontradas em humanos e cães saudáveis.

Resultados semelhantes foram encontrados por KURAZONO *et al.* (2003) onde apontaram a presença de genes *pap*, *sfa*, *afa*, *hly*, *aer* e *cnf* em estirpes de *E. coli* isoladas de fezes normais e urina de cães. Por sua vez, FÉRIA *et al.* (2000) detectaram diferentes fatores de virulência em estirpes isoladas de infecção do trato urinário de humanos, cães e gatos, sendo que aerobactina (*aer*) apresentou a maior frequência entre os gatos, hemolisina (*hly*) entre os humanos e pili associados a pielonefrite (*pap*) entre os cães, sugerindo uma adaptação de *E. coli* uropatogênica aos receptores celulares de cada hospedeiro. YURI *et al.*, 1998, encontram grande número de genes de virulência em material fecal e urina de cães e gatos com ITU e relatou ainda que há possibilidade destas bactérias transitarem entre os sítios, causando, assim a ITU.

Em mulheres, a microbiota fecal é reconhecida como reservatório de microrganismos potencialmente causadores de infecções bacterianas do trato urinário (WADAS *et al.*, 1996). Este fato pode justificar que a transmissão de genes de virulência não está necessariamente no sentido de animal para humano como se suspeitava, mas que estas mulheres com infecções recorrentes estejam selecionando estas estirpes e assim criando um trânsito genético constante entre as espécies. Em estudo realizado por JOHNSON *et al.* (2001) apontou semelhanças entre amostras de ExPEC humana e canina com relação aos fatores de virulência, baseado no polimorfismo genético, mas não comprovou a transmissão cruzada entre as espécies ou excluiu a possibilidade de humanos e caninos adquirirem o mesmo tipo de *E. coli* de origem externa comum.

Para a verificação de semelhanças genéticas entre as cepas de origem humana e de seus respectivos animais de estimação foi realizada a técnica de ERIC-PCR, o presente trabalho revelou que dos sete pares estudados nenhum apresentou similaridade, ou seja, em nenhum dos pares houve semelhanças, o que indica que a origem das ITUs das mulheres são de outras fontes de transmissão, que não seus animais de companhia.

Segundo SANCAK *et al.* (2004), a *E. coli* é um dos principais microorganismos componentes da microbiota intestinal dos seres humanos e dos animais. De acordo com BEUTIN (1999), as estirpes de *E. coli* uropatogênicas isoladas da microbiota fecal e de infecções extra-intestinais de cães foram similares às linhagens uropatogênicas isoladas de humanos quanto aos seus atributos de virulência. Segundo este pesquisador, os cães devem apresentar um papel importante como reservatórios deste microrganismo 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.

JOHNSON *et al* (2008) afirmaram que os humanos estudados apresentavam essa característica de forma mais evidente que seu respectivo animal de estimação, e sugere que segundo seus resultados encontrados demonstram uma “unidade doméstica microbiológica”, podendo caracterizar potencial zoonótico além da persistência de clones patogênicos. Uma das preocupações é que este intercâmbio genético bacteriano possa, além de causar infecções importantes, selecionar bactérias cada vez mais resistentes, como as observadas no presente trabalho entre as mulheres.

As cepas de *E. coli* de origem humana apresentaram altos níveis de resistência antimicrobiana, especialmente para ampicilina e amicacina com 68,57%, tetraciclina com 88,57%, estreptomicina com 94,28% e ácido nalidíxico e ciprofloxacino com 97,14%. Tais resultados poderiam indicar transmissão, pois outros trabalhos citam altas porcentagens de cepas resistentes presentes na microbiota fecal de cães e gatos, especialmente quando estes apresentam algum tipo de desarranjo da microbiota, cães diarreicos, por exemplo.(WEESE,2008 e PAULA & MARIN, 2008). Este fato não foi confirmado, pois ao contrário do que se esperava, as cepas de *E. coli* isoladas dos animais de companhia do presente trabalho apresentaram valores menores de resistência.

Para as cepas de *E. coli* dos animais de estimação destas pacientes com ITU os resultados foram menos expressivos, porém relativamente altos levando-se em

consideração que estes animais não apresentavam nenhum sinal de infecção aparente. Os antimicrobianos com maiores índices de resistência foram a amoxicilina /ácido clavulânico com 74,28%, ampicilina com 68,57% e cefalotina com 62,85%. Em um estudo realizado por PEDERSEN et al em 2007 cães apresentavam resistências antimicrobianas e tal fato foi justificado por tratamentos inadequados nestes animais, tal fato pode significar riscos à saúde humana por estarem selecionando bactérias resistentes em sua microbiota. GUARDABASSI et al, 2004, afirmam que justamente por estes motivos o uso de tais drogas em animais de companhia deve ser utilizado com cautela, a fim de se evitar problemas futuros.

A terapia das diferentes afecções bacterianas deveria fundamentar-se em testes de sensibilidade microbiana. Entretanto, a escolha dos antimicrobianos recai comumente na experiência profissional, no apelo comercial ou no custo de determinados produtos (RIBEIRO et al., 2006). Cresce também, de forma preocupante, a indicação desses fármacos por pessoas não habilitadas que atuam em estabelecimentos comerciais do ramo de animais de companhia. Com efeito, o uso indevido e indiscriminado dos antimicrobianos (subdoses, superdoses e descontinuidade da terapia) pode aumentar a pressão seletiva para linhagens multirresistentes em cães e gatos.

As cepas de origem humana apresentaram característica de multirresistência mais evidentes que as de origem animal, sendo 71,42% multirresistentes, contra 40% das cepas de origem animal. Outro fato marcante das cepas de origem humana com relação às de origem de seus animais de estimação é que o primeiro grupo apresentou cepas com resistência até nove antimicrobianos diferentes, enquanto o segundo a sete.

A presença de linhagens de *E. coli* multirresistentes aos antimicrobianos em animais de companhia evidencia para os riscos em saúde pública, em virtude da provável transmissão de ExPEC dos animais para o homem, em face do estreito contato entre essas espécies. MAYNARD et al. (2004), ao investigarem ExPEC isoladas de diferentes espécies animais e humanas, encontraram 60% de resistência às sulfonamidas e acima de 50% para tetraciclinas e ampicilina. A multirresistência a

três ou mais drogas foi encontrada em mais de 50% dos isolados, mostrando a similaridade de resistência entre linhagens isoladas de homens e outros animais.

7 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que nos isolados, independente de sua origem, há uma grande presença de genes precursores de fatores de virulência, que no caso de origem humana era esperado, por se tratar de pacientes com a ITU instalada, mas que o fato dos isolados de fezes de animais possuírem grande quantidade é motivo de preocupação, pois além de serem animais saudáveis, estes podem ser considerados reservatórios de cepas patogênicas extraintestinais e quando quaisquer medidas de higiene falhar, estas podem atingir os humanos e assim causar doença.

Conclui-se, também, que cepas patogênicas de *E. coli* estão presentes em urina de pacientes com ITU e em fezes de animais de estimação e que ainda pela técnica de ERIC-PCR observou dissimilaridades genéticas entre estes dois grupos bacterianos estudados, nos dando fortes indícios de que a transmissão não está presente.

Com todo o exposto pode-se concluir que ambas as espécies que habitam uma mesma residência apresentam graus de resistência antimicrobiana relativamente alta, porém não necessariamente para os mesmos antimicrobianos o que pode significar pouco intercâmbio de genes de resistência. Os níveis mais elevados de resistência e multirresistência em isolados de origem humana são justificados por se tratar de pacientes com ITU, na sua maioria recorrente, e que assim, estão sendo submetidos a seleções em cada tratamento realizado.

Por fim, fica claro, que apesar da não transmissão destas bactérias, medidas como uso correto de antimicrobianos e higiene são importantes até que mais estudos sejam realizados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAIL, L.; ITO, C. A. S. & ESMERINO, L. A. Infecção do trato urinário: comparação entre o perfil de susceptibilidade e a terapia empírica com antimicrobianos. **Rev. Bras. Anál Clín.**, 38(1): 51-56, 2006.

BARONDESS, J. J., BECKWITH, J. A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage λ . **Nature**, v. 346, p. 871-874, 1990.

BAUER, A. W. ; KIRBY, W. M.M.; SHERRIS, J.C. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. **Amer. J. of Clin. Path.**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINHUCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEUTZ, F.; Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like-toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 2483-2488, 1994.

BEUTIN, L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. **Vet. Res.**, v. 30, p. 285-298, 1999.

BEUTIN, L.; KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; KAUFUSS, S.; GLEIER, K. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1099-1108, 2004.

BINNS, M. M., DAVIES, D. L., HARDY, K. G. Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance. **Nature**, v. 279, p. 778-781, 1979.

BINNS, M. M. MAYDEN, J., LEVINE, R. P. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes traT of R100 and iss of ColV, I-K94. **Infection and Immunity**, v. 35, n. 2, p. 654-659, 1982.

BLACK, J. G.. Microbiologia – Fundamentos e Perspectivas. Ed. 4ª. Rio de Janeiro, RJ. Editora Guanabara Koogan S.A.. Pág. 520-521. 2002.

BRANGER, C., *et al* “Genetic Background of *Escherichia coli* and Extended-Spectrum β -Lactamase Type” – **Emerging Infections Diseases**, v. 11, No. 1, p. 54-61, 2005.

BRUMMFITT W, GARGAN R. A. Periuretral enterobacterial carriage preceding urinaryinfection. **Lancet**; 1:824-26, 1987.

BRYAN, A., ROESCH, P., DAVIS, L., MORITZ, R., PELLET, S., WELCH, R.A. "Regulation of Type 1 Fimbriae by Unlinked FimB- and FimE-Like Recombinases in Uropathogenic *Escherichia coli* Strain CFT073" - **Infection and Immunity**, v. 74, No. 2, p. 1072-1083, 2006.

COTA, E., JONES, C., SIMPSON, P., ALTROFF, H., ANDERSON, K. L., DU MERLE, L., *et al.* The solution structure of the invasive tip complex from Afa/Dr fibrils. **Molecular Microbiology**. v. 62, p. 356–366, 2006.

CHANSIRIPORNCHAI, N., RAMASOOTA, P., SASIPREYAJAN, J., SVENSON, S. B. Differentiation of avian *Escherichia coli* (APEC) isolates by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Veterinary Microbiology**, v.80, n.1, p.75-80, 2001.

CHUBA, P. J., LEON, M. A., BANERJEE, A., PALCHAUDHURI, S. Cloning and DNA sequence of plasmid determinant iss, coding for increased serum survival and surface exclusion, which has homology with lambda DNA. **Molecular and General Genetics**, v. 216, p. 287-292, 1989.

CHUBA, P. J., PALCHAUDHURI, S., LEON, M. A. Contributions of traT and iss genes to the serum resistance phenotype of plasmid ColV2-K94. **FEMS Microbiology Letters**, v. 37, p. 135-140, 1986.

COSTA, D., POETA, P., SÁENZ, Y., COELHO, A.C., MATOS, M., VINUÉ, L., RODRIGUES, J., TORRES, C. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. **Vet Microbiol.**127(1-2):97-105, 2008.

DRESCHER, G., COSTA, M. M., MACIEL, M. N., MATTIELLO, S. P., PICCINI, C. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados causadores de mastite em ovelhas do Município de Xanxerê, SC. In: XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 2006, Gramado. Anais do XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária. Gramado: **SOVERGS**, 2006.

DUCHAUD, E., RUSNIOK, C., FRANGEUL, L. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **National Biotechnology**, v. 21, n.11, p.1307-1311, 2003.

EDWARDS, P.R.; EWING, W.H. **Identification of Enterobacteriaceae**. 3^a ed. Minneapolis, Buurgess, 1972.

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. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.485, p.305-308, 2000.

GUAN, S., XU, R., CHEN, S., ODUMERU, J., GYLES, C. Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animals and human sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2690-2698, 2002.

GUARDABASSI, L., SCHWARZ, S., LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 54, 321–332, 2004.

GUPTA, K.; SAHM, D.F.; MAYFIELD, D.; STAMM, W.E. Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community - acquired urinary tract infections in women: a national analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v.33, p.89-94, 2001

HIRSH, D. C., ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 464, 2003.

HULTON, C. S. J., HIGGINS, C. F., SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v.5, p.825-834, 1991.

JOHNSON, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.4, p.80-128, 1991.

JOHNSON, T. J., WANNEMUEHLER, Y., DOETKOTT, C., JOHNSON, S. J., ROSENBERGER, S. C., NOLAN, L. K. Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. **Journal of Clinical Microbiology**. V.46. 3987-3996. 2008.

JOHNSON, J. R. & KUSKOWSKI, M. Clonal origin, virulence factors, and virulence. **Infect Immun**, p. 424-425, 2000.

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, 2001.

JOHNSON, J.R., RUSSO, T. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*". **J. Lab. Clin. Med.**, v.139, n.3, p. 155-162, 2002.

JOHNSON J. R., RUSSO T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, 295:383-404, 2005.

JOHNSON, J. R., CLABOTS, C., KUSKOWSKI, M. A. Multiple-Host Sharing, Long-Term Persistence, and Virulence of *Escherichia coli* Clones from Human and Animal Household Members. **J. Clin. Microbiol.**, 46(12), 4078, 2008.

KARLOWSKY, J.A.; KELLY, L.J.; THORNSBERRY,C.; JONES, M.E.; SAHM, D.F. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. **Antimicrob. Ag. Chemother.**, v.46, n.8, 2002.

KESKIMAKI, M.; EKLUND, M.; PESONEM, H.; HEISKANEM, T.; SIITONEM, A. The study group. SPEC, EAEC, and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diag. Microbial. Infect. Dis.** V.40, p.151-156, 2001.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL JR., V.R.; SOMMERS, H.M. **Diagn. Microbiol.** Texto e atlas colorido. 2ª ed. São Paulo, Editora Panamericana, p. 61-132, 1997.

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. **Microbiology and Immunology**, v.47, p.797-802, 2003.

LANE, M.C., ALTERI, C.J., SMITH, S.N., MOBLEY, H.L.T. Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 104: 16669-16674, 2007.

LAW, D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin producing *E. coli*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 729-745, 2000.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the pap, afa and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, n.5, p.1189-1193, 1992.

LINDSAY, N., ANDERSON, A. M. P., CONLY, J., MAINPRIZE, T. C., MEUSER, J., NICKEL, J. C., SENIKAS, V. M. "Uncomplicated urinary tract infection in women - Current practice and the effect of antibiotic resistance on empiric treatment" - **Canadian Family Physician**, v. 52, p. 612-618, 2006.

LLOYD, A. L., RASKO, D. A., MOBLEY, H. L. T. "Defining Genomic Islands and Uropathogen-Specific Genes in Uropathogenic *Escherichia coli*" - **Journal of Bacteriology**, v.189, No. 9, p. 3532-3546, 2007.

LUND, B. MARKLUND, B. I., STROMBERG, N., LINDBERG, F., KARLSSON, K. A., NORMARK, S. Uropathogenic *Escherichia coli* can express serologically identical pili of different receptor binding specificities. **Mol Microbiol**, v.2, n.2, p.255-263, 1988.

MARTIN, B., HUMBERT, O., CAMARA, M., GUENZI, E., WALKER, J., MITCHEL, T., ANDREW, P., PRUDHOMME, M., ALLOING, G., HAKENBECK, R., MORRISON, D. A., BOULNOIS, G. J., CLAVERY, J. P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p.3479-3483, 1992.

MATSUDA, K., CHAUDHARI, A. A., LEE, J. W. Avian colibacillosis caused by an intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolate from calf diarrhea. **Research in Veterinary Science**. V 89. p. 150-152. 2010.

MAURER, J. J.; BROWN, T. P.; STEFFENS, W. L.; THAYER, S. G. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 42, p. 106–118, 1998.

MARTINO, M. D. V., TOPOROVSKI J., MÍMICA, M. I. Bacteriological methods for screening urinary tract infection during childhood and adolescence. **Jornal Brasileiro de Nefrologia** 24:71-80, 2002.

MAYNARD, C., BEKAL, S., SANSCHAGRIN, F. *et al.* Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates from animal and human origin. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.5444-5452, 2004.

MOHAPATRA, B. R., BROERSMA, K., NORDIN, R., MAZUMDER, A. Evaluation of Repetitive Extragenic Palindromic-PCR for discrimination of fecal *Escherichia coli* from humans, and different domestic- and wild-animals. **Microbiology and Immunology**, v.51, p.733-740, 2007.

NOLAN, L.K.; WOOLEY, R.E., BROWN, J., BLUE, J. L., CAMP, M. Comparison of virulence factors and antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* strain from humans and dogs with urinary tract infections. **J. Vet. Int. Med.** p. 152-157, 1987.

NORMARK, B. H., NORMARK, S. “Evolution and Spread of Antibiotic Resistance” – **Journal of Internal Medicine**, v. 252, p. 91-106, 2002.

NOWICKI, B., SELVARANGAN, R., NOWICKI, S. Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. **Journal of Infectious Diseases**. v. 183, (Suppl. 1):S24–7, 2001.

OPAL, S.M., CROSS, A.S., GEMSKI, P., LYHTE, L.W. Aerobactin and hemolysin as virulence determinants in *Escherichia coli* isolated from human blood, urine, and stool. **J. infect. Dis.**, v.161, p.794-796, 1990.

ORDEN, J.A., RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A., GARCIA, S., CID, D., DE LA FUENTE, R. In vitro susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic dairy calves to 15 antimicrobial agents. **J. Vet. Med. B.**, v. 47, p. 329- 335, 2000.

ORENSTEIN, R., WONG, E.S. Urinary tract infections in adults. **Am Fam Physician**. 59: 1225-1234, 1237, 1999.

PROVENCE, D. L., CURTISS, R., III. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infect. Immun.** v.62, n.4, p.1369-1380, 1994.

PAULA, C. J. S., MARIN, J. M. Isolation of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from diarrheic dogs and their antimicrobial resistance profile. **Brazilian Journal of Microbiology** 39:498-500, 2008.

PEDERSEN, K., JENSEN, H., FINSTER, K., JENSEN, V. F., HEUER, O. E. Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** 60, 775–781, 2007.

POLETTI, K. Q. & REIS, C. - Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na cidade de Goiânia, GO. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol.38, no.5, p.416-420, 2005.

PUNTE, J. L., FINLAY, B. B. Pathogenic *Escherichia coli*. In: Principles of Bacterial Pathogenesis. San Diego: **Academic Press**, p. 826, 2001.

RIBEIRO, M. G., COSTA, E. O., LEITE, D. S. *et al.* Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, p.724-731, 2006.

RILEY, L. W. *Molecular Epidemiology of Infections Diseases - Principles and Practice*, **ASM Press**, Washington, DC, 2004.

RODRIGUES, J.; THOMAZINI, C.M.; LOPEZ, C.A.M.; DANTAS, L.O. Concurrent infection in a dog and colonization in a child with human enteropathogenic *Escherichia coli* clone. **J. Clin. Microbiol.**, V. 42, P. 1338- 1339, 2004.

RUSSO, T.A.; JOHNSON, J.R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.**, v.181, p. 1753-1754, 2000.

SALDAÑA, Z., ERDEM A. L, SCHÜLLER S, OKEKE I. N, LUCAS M, SIVANANTHAN A, PHILLIPS A. D, KAPER J. B, PUNTE J. L, GIRÓN J. A. "The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*." - *J Bacteriol*, v. 191, n.11, p. 3451-3461, 2009.

SANCAK, A. A.; HUTGERS, H. C.; HART, C. A.; BATT, R. M. Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea. **Vet. Rec.**, v. 154, p. 101-106, 2004.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 18, p. 264–292, 2005.

SIDJABAT, H. E., CHIN, J. J. C., CHAPMAN, T., WU, K., ULETT, G. C., CHERYL, L. O., SCHEMBRI, M. A., JOHNSON, J. R., TROTT, D. J. Colonisation dynamics and virulence of two clonal groups of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs. **Microbes and Infection**, 11 1: 100-107, 2009.

SILVEIRA, W.D.; BENETTI, F.; LANCELLOTTI, M.; FERREIRA, A.; SOLFERINI, V.N.; BROCCHI, M. Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.43, n.6, p.303-310, 2001.

SILVEIRA, W.D., FERREIRA, A., LANCELLOTTI, M., BARBOSA, I. A. G. C. D., LEITE, D. S., CASTRO, A. F. P., BROCCHI, M. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 89, p.323-328, 2002.

SIQUEIRA, A. K., RIBEIRO, M. G., LEITE, D. S., TIBA, M. R., MOURA, C. D., LOPES, M. D., PRESTES, N. C., SALERNO, T. & SILVA, A. V. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. **Res Vet Sci** 86, 206–210. 2009

SMITH, J. L., FRATAMICO, P.M., GUNTHER, N.W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathog. Dis.** 4(2): 134-63, 2007

SNYDER, J. A., *et al.* "Coordinate Expression of Fimbriae in Uropathogenic *Escherichia coli*" - **Infection and Immunity**, Vol. 73, No. 11, p. 7588-7596, 2005.

SOBEL, J.D. Bacterial etiologic agents in the pathogenesis of urinary tract infection. **Med. Clin. North Am.**, v.75, n.2, p.253-273, 1991.

SODERHALL, M., BERGERHEIM, U.S.R. BERGERHEIM, JACOBSON S. H., LUNDAHL J., MOLLBY, R., NORMARK, S., WINBERG, J. Molecular Evidence for Pap-G Specific Adhesion of *Escherichia coli* to Human Renal Cells. **The Journal of Urology**, v157, p 346-350, 2005.

SZÁSZ, M., LEHOTKAI, N., KRISTÓF, K., SZABÓ, D., NAGY, K. Prevalence and antimicrobial resistance of uropathogens in different inpatient wards. **Acta Microbiol Immunol Hung.** 56(4):375-87, 2009.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiol.** terceira ed., ed. Atheneu, Rio de Janeiro. 586 p., 2002.

VERSALOVIC, J., KOEUTH, T., LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. v.19, p.6823-6831, 1991.

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, n.3, p. 287-290, 1998.

WADAS, B., KÜHN, I., LAGERSTEDT, A. S., JOHNSON, 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.

WEBER, S., COSTA, M. M., SILVA, M. S. E., MABONI, F., FERRONATO, A. I., DRESCHER, G., VARGAS, A. C., SCHRANK, Silveira, I. Caracterização molecular e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados clínicos e ambientais de *E. coli* In: XXV Reunião de Genética de Microrganismos, 2006, SãoPedro. Anais da XXV Reunião de Genética de Microrganismos. São Pedro: **XXVREGEM**, p.102-102, 2006.

WEESE, J. S. Antimicrobial resistance in companion animals. **Animal Health Research Reviews** 9(2); 169–176, 2008.

WHITE, D.G, ZHAO, S., SIMJEE, S., WAGNER, D., McDERMOTT, P.F. Antimicrobial resistance of food borne pathogens. **Microb. and Infection**, v. 4, p. 405-412, 2002.

WOOD, T.K, BARRIOS, A.F.G, HERZBERG, M, LEE, J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 72: 361-367, 2006.

9- SUMMARY

A hundred-ten *Escherichia coli* strains was isolated from 2008 to 2011, among them 59 were from women with urinary tract infection (UTI) and 51 were from their pets collected by rectal swab. The virulence genes was search by PCR and the most found genes were *fimH* (100%), *hly* (44%) and *iss* (42.3%) all of then from women. Also was used the ERIC-PCR method to check the similarity among both bacterial groups analyzed. The results showed different patterns for each pair women-animal bacterial isolates. In general the isolates from human showed more resistance to the antimicrobial drugs examined, the highest resistance rate was for nalidixic acid (97.1%) and for streptomycin (96.0%) both from human isolates. The results obtained in this study do not permit to suggest a transmission of bacterial strains involving humans and their companion animals.

Keywords: multidrug resistance, transmission, dogs, urinary tract infection.

10 - ANEXOS