UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

ESTUDO DE VIGILÂNCIA BACTERIOLÓGICA: ISOLAMENTO, FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE GATOS DOMÉSTICOS NA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO.

Marly Cristina Wanderley Caliman

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

ESTUDO DE VIGILÂNCIA BACTERIOLÓGICA: ISOLAMENTO, FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE GATOS DOMÉSTICOS NA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO.

Marly Cristina Wanderley Caliman

Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, "Campus" de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.
Área de Concentração em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Junho de 2010

Caliman, Marly Cristina Wanderley
C153e Estudo de Vigilância Bacteriológica: Isolamento, Fatores de Virulência e Resistência Antimicrobiana de Cepas de *Escherichia coli* isoladas de Gatos Domésticos na Região de Ribeirão Preto / Marly Cristina Wanderley Caliman. – – Jaboticabal, 2010
xvii, 96 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: José Moacir Marin
Banca examinadora: Maria de Fátima Martins, Tammy Priscilla Chioda Delfino
Bibliografia

1. *Escherichia coli*. 2. Fatores de Virulência. 3. Resistência Antimicrobiana. 4. Gatos Domésticos I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.981.2:636.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTUDO DE VIGILÂNCIA BACTERIOLÓGICA: ISOLAMENTO, FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE GATOS DOMÉSTICOS NA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO.

AUTORA: MARLY CRISTINA WANDERLEY CALIMAN

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSÉ MOACIR MARIN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOSÉ MOACIR MARIN
Departamento de Ciências Morfológicas / Universidade de São Paulo / Ribeirão Preto/SP

Profa. Dra. MARIA DE FATIMA MARTINS
Departamento de Nutrição e Produção Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP / Pirassununga/SP

Profa. Dra. TAMMY PRISCILLA CHIODA DELFINO
Colégio Técnico Agrícola / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 25 de junho de 2010.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARLY CRISTINA WANDERLEY CALIMAN – Nascida em 11 de junho de 1961, em São Paulo-SP. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) Campus de Jaboticabal-UNESP, em agosto de 1983. Especializou-se em Biologia pela Universidade de Franca (UNIFRAN) em 1986. Em março de 2008 iniciou curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária na FCAV-UNESP Jaboticabal, concluindo-o em julho de 2010. Trabalha em clínica e cirurgia de pequenos animais na cidade de Ituverava desde 1985. Foi docente da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ituverava (FFCL) de 1985 a 2002 onde ministrou a disciplina de Biologia. É docente do curso de Medicina Veterinária da Faculdade Dr. Francisco Maeda (FAFRAM) em Ituverava desde 2008 onde ministra as disciplinas de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos e Epidemiologia e Saneamento Ambiental Aplicado. É membro do Comitê de Ética em Pesquisas da FAFRAM desde 2008. Supervisiona estágio de conclusão de curso na área de clínica e cirurgia de pequenos animais.

Ergo os olhos aos montes
De onde virá meu socorro?
O meu socorro vem do Senhor,
Que fez o céu e a terra.
Não te deixará tropeçar,
O teu guarda jamais dormirá!
Sim, não dorme nem cochila
O guarda de Israel
O Senhor é teu guarda, tua sombra,
O Senhor está à tua direita.
De dia o sol não te ferirá
Nem a lua de noite.
O Senhor te guarda de todo o mal,
Ele guarda a tua vida:
O Senhor guarda a tua partida e chegada,
Desde agora e para sempre.

Salmo 121 (120) – *O Guarda de Israel*
Bíblia de Jerusalém

DEDICO,

Ao meu pai, Humberto (*in memorian*), pelo maravilhoso exemplo de caráter e por sua grande dedicação aos filhos.

À minha mãe, Marly, mulher incomparável, sábia, generosa e prudente. Seu amor e sua força me ensinaram o significado da fé e esperança.

Aos meus amados filhos, Odair júnior, Mariana e Daniel. Vocês são o maior tesouro que Deus, em sua imensa bondade, me concedeu!

À querida tia Marisa, por seu bom humor, carinho, dedicação e muita disposição em ajudar em todos os momentos.

À minha querida neta Isabella, nada se compara à alegria que seu sorriso me traz!

AGRADECIMENTOS

Eu te louvo e bendigo Senhor meu Deus, fonte de todo bem e toda graça, por me conceder vida e saúde e ainda me abençoar com amigos e colaboradores preciosos para a realização deste trabalho. Agradeço a todos, especialmente:

Ao prof. Dr. José Moacir Marin, pela oportunidade que me foi dada, pela paciência diante de minhas limitações, a amizade e pela excelente orientação.

À profa. Dra. Regina Helena Nogueira Couto, caríssima amiga e irmã em Cristo, que de muitas formas me ajudou, tanto intelectual como espiritualmente.

Ao amigo Cleber, pela indicação, apoio, incentivo e preciosas sugestões.

Aos meus queridos irmão e cunhada, Gilberto e Valdiléia, mesmo à distância, seu amor e carinho sempre se fizeram presentes. E especialmente à Valdiléia pela valiosa colaboração.

À Lígia e Diego, pelo apoio, pelas palavras de carinho e incentivo.

À Tânia Marques da Silva, técnica do laboratório de Genética do departamento de Morfologia, Fisiologia e Estomatologia da USP, pela amizade, carinho e contribuição na realização deste trabalho.

À Aline, querida amiga, por sua grande contribuição e incentivo.

À amiga Patrícia, pelos momentos compartilhados, as orações e as palavras de fé e ânimo.

À Dra. Maria Emília, pelos esclarecimentos e colaboração.

À Eneida, amiga de trabalho, sua colaboração e apoio foram fundamentais.

À médica veterinária Gisele, do centro de especialidades veterinárias Nucleon, pela preciosa contribuição com o envio de várias amostras.

À biomédica Maura, do laboratório Municipal de Ituverava, por várias sugestões e esclarecimentos.

À Edna, secretária do departamento de microbiologia da UNESP - Jaboticabal, por sua constante dedicação.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, sempre atenciosos e prestativos.

À UNESP - Jaboticabal pelo curso.

Aos Docentes do Programa de Microbiologia Agropecuária, pelos ensinamentos.

SUMÁRIO

Página

1 – INTRODUÇÃO **01**
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **03**
2.1 – *Escherichia coli* **03**
2.2 - Tipos de *E. coli* e caracterização epidemiológica **04**
2.2.1 – *E. coli* comensal e a microflora **04**
2.2.2 – *E. coli* patogênica intestinal ou diarreiogênica **05**
2.2.3 – *E. coli* enteropatogênica (EPEC) **06**
2.2.4 – *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) **07**
2.2.5 – *E. coli* shigatoxigênica (STEC) **08**
2.2.6 – *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) **10**
2.2.7 – *E. coli* enteroagregativa (EAEC) **11**
2.2.8 – *E. coli* difusoaderente (DAEC) **12**
2.2.9 – *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) **12**
2.3 – A microbiota intestinal de gatos **13**
2.4 – A diarréia em gatos **16**
2.5 – O trato urinário de gatos e as infecções urinárias **17**
2.6 – Fatores de virulência **19**
2.7 – Antimicrobianos **23**
2.7.1 – Principais classes de antimicrobianos e mecanismos de ação **24**
2.7.1.1 - Inibidores da síntese da parede celular: Antibióticos *B*-lactâmicos (penicilina e cefalosporinas**)** **24**
2.7.1.2 - Inibidores da síntese protéica **25**
2.7.1.3 - Inibidores da replicação e transcrição do ácido nucléico **26**
2.7.1.4 - Inibidores das funções das membranas celulares **26**
2.7.1.5 - Antimetabólitos **26**
2.8 – Considerações sobre a resistência microbiana **27**
2.9 – Os animais de companhia nos dias atuais **31**

3 – OBJETIVOS **34**
4 – MATERIAL E MÉTODOS **35**
4.1 – Coleta **35**
4.2 – Isolamento e Identificação **36**
4.3 – Testes de Susceptibilidade **40**
4.4 – Extração do DNA bacteriano **42**
4.5 – Amplificação do DNA **43**
4.6 – Manutenção das Amostras de *E. coli* **46**
5 – RESULTADOS **47**
6 - DISCUSSÃO **65**
7 – CONCLUSÕES **76**
8 – REFERÊNCIAS **78**
9 – APÊNDICE **94**

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – A: Tubo com meio de Rugai-lisina sem inóculo e **B:** colônias lactose positivas no meio Mac Conkey..... **38**

Figura 02 – A: Amostra positiva para *E. coli* em meio Rugai com lisina e **B:** amostra citrato positiva (à esquerda), amostra citrato negativa (à direita)..... **38**

Figura 03 – Identificação bioquímica de Enterobactérias contendo provas de Indol, LTD, sacarose, glicose, produção de gás, urease, H_2S, lisina e motilidade..... **39**

Figura 04 – Cultura de *E. coli* contendo os antimicrobianos: NAL, PIP, NOR, NIT, CIP, GEN, TET, TOB, AMI, SUT e mostrando resistência a tetraciclina (TET)..... **41**

Figura 05 - Cultura de *E.coli* contendo os antimicrobianos: AMC, CPM, ATM, CRX, CFL; AMC, CAZ, CRO, CFO; IPM e AMP..... **42**

Figura 06 - Distribuição de gatos saudáveis estudados entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto-SP, segundo faixa etária e sexo..... **47**

Figura 07 - Distribuição de gatos diarréicos estudados entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto-SP, segundo faixa etária e sexo..... **48**

Figura 08 - Distribuição de gatos com ITU estudados entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto-SP, por faixa etária e sexo.... **48**

Figura 09 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR)..... **52**

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR)..... **53**

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR)..... **54**

Figura 12 - Representação da resistência, sensibilidade intermediária e sensibilidade entre as cepas isoladas os gatos saudáveis, diarréicos e com

ITU, entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto..... **59**

Figura 13 – Gatos diarréicos: resistência e sensibilidade intermediária em cepas de origem fecal de *E.coli* isoladas de gatos diarréicos entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto..... **61**

Figura 14 – Gatos saudáveis: representação da resistência e sensibilidade intermediária em cepas de origem fecal de *E.coli* isoladas de gatos saudáveis entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto..... **61**

Figura 15 – Gatos com ITU: resistência e sensibilidade intermediária em cepas de origem urinária de *E.coli*. isoladas de gatos com ITU entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto..... **62**

Figura 16 – Relação entre número de animais vivendo juntos e a presença de genes de virulência, resistência, sensibilidade intermediária e sensibilidade a antimicrobianos..... **64**

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Características de colônias de Enterobactérias em meio Mac Conkey..... **36**

Tabela 02 - Quantidades de cada reagente utilizadas na reação para detecção dos genes *stx₁, stx₂, eae*..... **43**

Tabela 03 - Primers utilizados na PCR para amplificação de fragmentos específicos dos genes *stx₁*, *stx₂*, *eae*..... **44**

Tabela 04 – Quantidades de cada reagente utilizadas na reação para detecção dos genes *pap, afa, sfa*..... **45**

Tabela 05 - Primers utilizados na PCR para amplificação dos fragmentos específicos dos genes *pap, sfa, afa*..... **45**

Tabela 06 - Perfil bioquímico de algumas enterobactérias de importância clínica incluindo *E.coli e E.coli* inativa segundo Manual de Microbiologia da ANVISA (2004)..... **50**

Tabela 07 - Perfil bioquímico das cepas de *E. coli* isoladas entre gatos saudáveis, diarréicos e com ITU, entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto e de *E. coli* e *E. coli* inativa segundo Manual Microbiológico da ANVISA (2004)..... **51**

Tabela 08 - Percentuais de cepas apresentando características bioquímicas semelhantes às de *E. coli* inativa isoladas de gatos saudáveis, diarréicos ou com ITU, entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto..... **51**

Tabela 09 - Presença dos genes *eae, pap* e *sfa* entre os gatos saudáveis, diarréicos e com ITU estudados entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto..... **55**

Tabela 10 - Número de cepas (e percentuais) de resistência, sensibilidade intermediária e sensibilidade entre os grupos de animais estudados (em relação ao total de cepas de cada grupo) entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto..... **57**

Tabela 11 - Perfil de susceptibilidade a 20 agentes antimicrobianos de cepas de origem fecal de *E. coli* isoladas de gatos saudáveis e diarréicos e de cepas urinárias isoladas de gatos com sintomas de ITU, entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto..... **58**

Tabela 12 – Fenótipo de resistência entre cepas de *E. coli* isoladas de gatos saudáveis (n=95 cepas), gatos diarréicos (n=95 cepas) e gatos com sintomas de ITU (n=15 cepas) entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto..... **60**

Tabela 13 - Presença dos genes *eae, pap e sfa* em relação à sensibilidade, sensibilidade intermediária e resistência a antimicrobianos entre gatos diarréicos e saudáveis estudados entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto..... **62**

Tabela 14 - Relação entre número de animais no mesmo ambiente, genes de virulência, resistência e sensibilidade intermediária para cepas de *E. coli* no grupo dos gatos saudáveis..... **63**

ESTUDO DE VIGILÂNCIA BACTERIOLÓGICA: ISOLAMENTO, FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE GATOS DOMÉSTICOS NA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO.

RESUMO – A resistência antimicrobiana em bactérias de origem animal tem se caracterizado como importante problema de saúde pública. No Brasil, muitos trabalhos têm verificado a presença de fatores de virulência e resistência em cepas de *Escherichia coli* isoladas de animais de produção, porém há poucos estudos avaliando estes aspectos em animais de companhia. O presente trabalho verificou o perfil de sensibilidade microbiana e a presença dos genes codificadores de adesinas (*pap*, *sfa*, *afa)*, de intimina (*eae*) e de Shiga toxina (stx_1, stx_2) em cepas fecais de *E. coli* obtidas através de swabs retais de gatos diarréicos e de saudáveis, e em cepas urinárias de gatos com sintomas de infecção do trato urinário (ITU) apresentados para consultas e vacinação em clínicas veterinárias da região de Ribeirão Preto. Entre Janeiro e dezembro de 2009 foram isoladas 205 cepas de *E. coli* que foram caracterizadas quanto à presença de genes codificadores de fatores de virulência por PCR e sensibilidade microbiana pelo método de difusão em discos. O gene *sfa* ocorreu em maior abundância (35,6%) sendo mais freqüente entre animais com diarréia e ITU que entre os saudáveis. O gene *eae* foi verificado apenas entre os diarréicos (2,4%) e sempre associado ao *sfa.* O gene *pap* ocorreu em todos os grupos (22,43%). Genes stx_1,stx_2 e *afa* não foram encontrados. As resistências predominantemente observadas foram para cefalotina (42,1%), tetraciclina (20%) e ampicilina (15,8%) entre os isolados dos gatos diarréicos enquanto nos dos saudáveis as resistências mais freqüentes foram tetraciclina (30,5%), cotrimoxazol (17,9%) e ampicilina (20,0%). Gatos com ITU apresentaram maiores resistências para ampicilina (46,7%), cefalotina (13,3%) e ácido nalidíxico (13,3%). Multiresistência foi encontrada em 8,4%, 17,9% e 33,3% das cepas isoladas de gatos diarréicos, saudáveis e com sintomas de ITU respectivamente. O fenótipo de resistência ampliada aos betalactâmicos (ESBL) não foi encontrado. Uma inesperada variação na fermentação da sacarose, na descarboxilação da lisina e na produção de gás em algumas cepas sugere a presença de *E. coli* Alkalescens-Dispar entre os isolados.

PALAVRAS-CHAVE: agente antimicrobiano, *Escherichia coli*, gato, genes de virulência, resistência a múltiplas drogas.

BACTERIOLOGICAL STUDY OF SURVEILLANCE: ISOLATION, VIRULENCE FACTORS AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF STRAINS OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM DOMESTIC CATS IN THE REGION OF RIBEIRÃO PRETO.

SUMMARY – Antimicrobial resistance in animal origin bacteria has been characterized as an important public health problem. In Brazil, many studies have verified the presence of antimicrobial virulence factors and resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from livestock, however there are few studies evaluating these aspects in pets. The current work verified the sensibility profile and the presence of genes encoding adhesins (*pap, sfa, afa*) intimin (*eae*) and Shiga toxin (*stx1*, *stx2*) in *E. coli* fecal strains obtained from rectal swabs from diarrheic and healthy cats and urinary strains from cats with symptoms of urinary tract infection (UTI) presented to be consulted and get vaccination in veterinary clinics in the region of Ribeirão Preto. Between January and December 2009 were isolated 205 strains of *E. coli* that have been characterized for the presence of genes encoding virulence factors by PCR and microbial sensitibility by disc diffusion method. The *sfa* gene occurred in greatest abundance (35.6%) was more common among animals with diarrhea and UTI than among the healthy. The *eae* gene was found only among diarrheic (2.4%) and always associated with *sfa*. The *pap* gene occurred in all groups (22.43%). Genes *stx1*, *stx2* and *afa* were not found. The predominantly observed resistance was to cephalothin (42.1%), tetracycline (20%) and ampicillin (15.8%) among the isolates from diarrheic cats while in the healthy the tetracycline resistance was most frequent (30.5%), allowed by cotrimoxazol (17.9%) and ampicillin (20.0%). Cats with UTI showed greater resistance to ampicillin (46.7%), cephalothin (13.3%) and nalidixic acid (13.3%). Multidrug resistance was found in 8.4%, 17.9% and 33.3% of strains isolated from diarrheic healthy and with symptoms of UTI cats, respectively. The phenotype of resistance extended to beta-lactams (ESBL) was not found. An unexpected change in the fermentation of sucrose, the decarboxylation of lysine and gas production in some strains suggests the presence of Alkalescens-Dispar *E. coli*- among isolates

KEY WORDS: *Escherichia coli*, cat, antimicrobial agent, virulence genes, resistance to multiple drugs.

1 – INTRODUÇÃO

O homem tem mantido um estreito contato com os animais desde tempos remotos, porém esta convivência tem se intensificado, principalmente em relação aos animais de estimação, e apesar de cães e gatos terem sido animais de companhia por milhares de anos, nunca estes tiveram um papel tão importante como componentes da sociedade humana como agora.

A proximidade com estes animais traz inegáveis benefícios ao homem, porém implica também em riscos à saúde, representados principalmente pelas zoonoses. Tais riscos assumem proporções ainda maiores diante da possibilidade de transferência de genes determinantes de virulência e de resistência aos antimicrobianos entre bactérias de origem animal e humana, bem como entre bactérias da microbiota normal e micro-organismos patogênicos de diversas origens.

Em vista destas considerações, a bactéria *Escherichia coli* pode ser caracterizada como importante patógeno emergente, pois, apesar de existir prevalentemente como comensal da microbiota da maioria dos animais de sangue quente, pode exibir sofisticados mecanismos de virulência sendo responsável por significativas afecções clínicas em homens e animais. Dentre estas afecções podem se destacar: meningite neonatal, septicemia, infecções do trato urinário, e diarréia que pode se manifestar tanto de forma branda, autolimitante quanto caracterizar quadros muito graves como a colite hemorrágica e a síndrome hemolítica urêmica.

Apesar da relevância, apenas recentemente tem-se dado importância epidemiológica às cepas de *E. coli* provenientes de animais de companhia. A constatação da semelhança entre isolados clínicos desta bactéria dos tratos intestinal e urinário de homens, cães e gatos tem sugerido que estes animais podem estar implicados na transmissão de cepas patogênicas intestinais e extra-intestinais para humanos.

Além da virulência, a resistência a antimicrobianos em cepas de *E. coli* tem sido motivo de grande preocupação para a saúde pública, principalmente diante da evidência de que antibióticos exercem uma pressão seletiva tanto em bactérias patogênicas quanto nas comensais da microbiota.

Desta forma, o aumento do uso de agentes antimicrobianos na clínica de pequenos animais, particularmente os de amplo espectro, tais como fluorquinolonas, cefalosporinas e penicilinas associadas ao ácido clavulônico têm agravado o problema da resistência. A emergência de fenótipos de resistência de relevância clínica como, por exemplo, as betalactamases de espectro estendido (ESBL) e a multiresistência em cepas de *E. coli* de origem animal ilustram bem a gravidade do problema.

Considerando a natureza da relação dos homens com seus animais de companhia e das implicações deste relacionamento em todos os setores da vida humana, o conhecimento dos riscos acerca desta proximidade e a melhor forma de evitá-los deve ser objeto de estudo.

Portanto, o crescente aumento da resistência aos agentes antimicrobianos, a possibilidade de transferência de fatores de virulência, a similaridade compartilhada por várias cepas de *E. coli* de animais e humanos e a percepção de que os animais de companhia estão cada vez mais estreitamente relacionados ao homem, são os motivos que conduzem à presente investigação que pretende isolar cepas de *E. coli* de fezes de gatos saudáveis ou diarréicos e de urina de gatos com sintomas de infecção do trato urinário, caracterizá-las quanto à presença de genes codificadores de virulência e ainda verificar a resistência destas cepas a diferentes agentes antimicrobianos.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* é um micro-organismo anaeróbio facultativo, Gram negativo, não esporulado, pertencente à família Enterobacteriacea. Primeiramente denominada *Bacterium coli commune,* foi, em 1885, identificada por Theodor Escherich como prevalente na microbiota de indivíduos saudáveis, e inicialmente considerada patogênica apenas em sítios extra intestinais. A constatação de sua capacidade de causar doença no trato intestinal, seu habitat natural, deu-se mais tarde com o reconhecimento da etiologia bacteriana de severos surtos de grastroenterite infantil no início do séc. 20 atribuídos a uma cepa de *E.coli* então denominada *Bacterium coli neopolitanum* (ROBINS-BROWNE, 1987). Seguiram-se, então, vários episódios de diarréia severa causados por *E. coli* de origem intestinal, recebendo cada cepa causadora de epidemia uma denominação de acordo com seu descobridor, o que obviamente causou muita confusão.

Fritz Kauffmann, em 1944, resolveu grande parte da questão de identificação das cepas pela adoção de um critério de classificação baseado na sorotipagem que é usado até os dias atuais (com modificações). De acordo com este esquema, *E. coli* é sorotipada com base na presença dos antígenos somáticos (antígeno O), flagelares (antígeno H) e capsulares (antígeno K) (NATARO & KAPER, 1998).

O antígeno O é parte do lipopolissacarídeo (LPS) que compõe a parede celular. A ordem, a composição e o número de oligossacarídeos que o formam conferem a diversidade deste antígeno. São conhecidos mais de 180 sorogrupos O e mais de 60 sorogrupos H, sendo possíveis mais de 10.000 combinações entre estes antígenos (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002).

A caracterização clinica, epidemiológica e genética permite que as cepas de *E. coli* sejam agrupadas em três grandes categorias: comensais, patogênicas

intestinais e patogênicas extra intestinais. As síndromes causadas pelas espécies patogênicas de *E. coli* podem ser divididas quanto à patogenia e sítios de ação em: infecções do trato urinário, sepse/meningite e gastroenterite (NATARO & KAPER, 1998).

2.2 - Tipos de *E. coli* e caracterização epidemiológica

2.2.1 *E. coli* comensal e a microflora:

A *E.coli* comensal da microbiota intestinal é considerada inofensiva para seu hospedeiro, e apenas em ocasiões especiais pode ocasionar doença, sendo desta forma considerada um patógeno oportunista. Contribui para as funções atribuídas à flora, entre as quais podem ser citadas: antibacteriana, imunomoduladora e nutricional**.**

O principal mecanismo de ação antibacteriana é através da ocupação de sítios de adesão celulares da mucosa pela flora autóctone, o que forma uma barreira mecânica à colonização de outras bactérias. Há outros mecanismos, como a competição pelos nutrientes disponíveis no meio, a produção de substâncias restritivas ao crescimento de bactérias alóctones e a produção *in vivo* de substâncias com ação antimicrobiana (TANNOK, 1999; LIÈVIN et al, 2000).

A ação imunomoduladora reflete-se na interação de bactérias da microbiota (e seus produtos) com o sistema imune, com efeitos em sua maturação e também na tolerância imunológica (GUARNER & MALAGELADA, 2003; YAN & POLK, 2004).

Alguns substratos chegam ao lúmen do cólon não digeridos e bactérias da microbiota podem fermentá-los formando ácidos graxos de cadeia curta, facilmente absorvíveis e que constituem importante fonte energética para os colonócitos com efeito trófico no epitélio intestinal (EDWARDS & PARRET, 2002). A microbiota também está relacionada com a síntese de vitamina K e outras

atividades metabólicas ainda pouco compreendidas como a conversão de colesterol em coprostanol (MIDVEDT et al, 1988).

Muitas variáveis interagem para estabelecer a barreira entre o comensalismo e a virulência em cepas de *E. coli*. O complexo balanço do estado do hospedeiro com a presença e expressão de fatores de virulência das cepas bacterianas pode significar a diferença entre a instalação da doença e os benefícios atribuídos às cepas comensais para seu hospedeiro (PICARD et al, 1999; KAPPER et al, 2004; EWERS et al, 2007).

Dentre as cepas comensais, uma se destaca particularmente, a *E.coli K-12*, que se caracteriza por ser incapaz de colonizar ou sobreviver no ambiente. Cerca de 20 % do genoma apresentado por cepas virulentas está ausente nesta cepa, que apresenta uma mutação dentro do grupamento de genes *rfb* que afeta a organização do antígeno O (BLUM et al, 1996 apud MELO, 2006). A maioria das cepas comensais origina-se do grupo filogenético A (RUSSO & JOHNSON, 2000).

2.2.2 - *E. coli* patogênica intestinal ou diarreiogênica:

São consideradas patógenos intestinais primários, caracterizando-se por causar gastrenterites ou colites quando ingeridas em quantidade suficiente (PELCZAR et al, 1997). São atualmente classificadas em seis patotipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC); enterotoxigênica (ETEC); shigatoxigênica (STEC) dentre esta a enterohemorrágica (EHEC); enteroinvasiva (EIEC); enteroagregativa (EAEC) e difusamente aderente (DAEC), de acordo com seus mecanismos de patogenicidade, fatores de virulência, modos de adesão em culturas de células epiteliais, e sintomas clínicos que causam (KAPER et al, 2004).

As *E.coli* patogênicas intestinais raramente causam doenças extra-intestinais, derivam do grupo filogenético A, B1, D ou linhagens que não têm um grupo específico, possuem distintos fatores de virulência, provavelmente adquiridos por transferência horizontal (plasmídeos, fagos e integrons) de

membros distintamente relacionados na evolução das linhagens (RUSSO & JOHNSON, 2000).

Cepas diarreiogênicas estão entre os primeiros patógenos para os quais técnicas moleculares de diagnóstico foram desenvolvidas e até hoje os métodos moleculares permanecem como uma das técnicas mais populares e mais realizáveis para a diferenciação entre cepas diarreiogênicas e cepas não patogênicas de amostras fecais (NATARO e KAPER, 1998).

2.2.3 - *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

Epidemiologicamente relacionada à diarréia infantil, afeta geralmente crianças de até dois anos e é considerada de alta morbidade em países pobres, podendo inclusive apresentar uma mortalidade elevada (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002).

As bactérias aderem à membrana plasmática do enterócito e causam destruição das microvilosidades adjacentes. A lesão é denominada “attaching and effacing” e se caracteriza por causar degeneração dos enterócitos e leve inflamação da lâmina própria. Ocorre uma adesão íntima que resulta no rearranjo do citoesqueleto, com conseqüente encurtamento das microvilosidades e perda da capacidade absortiva. Três etapas podem ser descritas na patogênese da lesão por EPEC: aderência localizada, transdução de sinal e íntima aderência (NATARO & KAPER, 1998).

Foi relatado um outro tipo de EPEC no qual o plasmídeo EAF está ausente, assim o gene *bfp* contido neste plasmídeo e que codifica a fímbria BFP também está ausente. Esta EPEC é chamada EPEC atípica (aEPEC). NGUYEN et al (2006) compararam casos de diarréias causadas por EPEC e aEPEC e chegaram à conclusão que a infecção por esta última caracteriza-se por um quadro mais brando, porém mais demorado.

Além de ocorrer em crianças, as EPECs podem acometer bezerros, cordeiros, suínos e cães (STELLA et al, 2008; FRANCO et al, 2008). Em gatos

ainda é pouco conhecida a prevalência de EPEC, porém POPISCHIL et al (1987) relataram a presença de *E. coli* enteropatogênica exibindo e fenótipo “attaching-effacing” em gatos com diarréia e MORATO et al (2008) citam gatos como prováveis reservatórios para humanos, tendo encontrado esta bactéria tanto em gatos diarréicos como em saudáveis.

2.2.4 - *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

As infecções caudadas por ETEC acometem principalmente crianças em países em desenvolvimento e viajantes destas áreas (KUHNERT et al, 2000; ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002).

Segundo artigo publicado pela Organização Mundial da Saúde, cepas ETEC são responsáveis por 380.000 mortes anuais (WHO, 1999). Porém, GUPTA et al (2008) registraram um reduzido número de estudos sobre a incidência de ETEC em países com índices de desenvolvimento humano (HDI) baixo e médio, sugerindo que mais pesquisas e melhor padronização da definição molecular de infecção por ETEC serão necessárias para comparar resultados entre estudos e fornecer dados mais precisos.

Os principais sintomas incluem fezes aquosas, vômitos, náuseas e cólicas intestinais. A diarréia pode ser branda e autolimitante em alguns casos, em outros, os sintomas são muito mais severos, havendo muita semelhança com a síndrome diarréica da cólera, ocasionada por *V.cholerae* (KAPER et al, 2004).

A patogenia deve-se à habilidade da bactéria de expressar enterotoxinas e adesinas que permitem a colonização de células do epitélio intestinal. Estas adesinas, conhecidas como antígeno fator de colonização (CFA-“colonization factor antigens”), permitem a ligação da bactéria às células da mucosa do intestino delgado, região onde a *E. coli* não ocorre em elevado número. Estes fatores de colonização geralmente são fímbrias de superfície e se ligam a receptores específicos da célula. Várias fímbrias foram identificadas: a fímbria Tipo I, antigamente classificada como antígeno capsular (K), K-99 atual F-5, K-88 atual

F4, outras adesinas como F41 e G87P (F-6). Enquanto há uma grande variedade de fatores de colonização produzidos por esta bactéria, apenas duas variedades de enterotoxinas são secretadas, as termolábeis (LT) e as termoestáveis (ST). As LTs são estreitamente relacionadas com a toxina da cólera, tanto biológica como antigenicamente (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002).

Estas infecções também acometem animais recém-nascidos, principalmente leitões, bezerros, cordeiros (KUHNERT et al, 2000) e cães (HAMMERMUELLER et al, 1995). ABAAS et al (1989) observaram associação significativa entre diarréia felina e a presença de verotoxina.

2.2.5 - *E. coli* shigatoxigênica (STEC)

As cepas STEC são caracterizadas por causar diarréia sanguinolenta, acometendo prevalentemente crianças e idosos em países desenvolvidos. Também podem causar lesões tipo “attaching-effacing” no intestino grosso, e nos casos mais severos, necrose. Tornou-se notória após dois grandes surtos em 1982 nos EUA, relacionados ao consumo de hambúrguer mal cozido. Estes surtos foram atribuídos à cepa O157: H7. Os sintomas clínicos incluem: cólica abdominal e diarréia inicialmente aquosa que progride para hemorrágica. Em países desenvolvidos é uma das principais causas relacionadas à diarréia associada à síndrome hemolítica urêmica (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002), podendo ocorrer em 2 a 7 % dos indivíduos acometidos (CLARKE, 2001).

Bovinos e pequenos ruminantes são considerados os principais reservatórios naturais de cepas STEC que acometem humanos (BETTELHEIM, 2003). A transmissão ocorre por alimentos contaminados, como carne, leite, queijos não pasteurizados, água, contato pessoal ou pode ser transmitida por animais (CLARKE, 2001; TRABULSI et al, 2002). A dose infectante é baixa, bastando 100 micro-organismos para causar a doença (NATARO & KAPER, 1998).

Inicialmente distinguia-se das demais cepas de *E. coli* pelo sorotipo (O157: H7), mas logo outra característica tornou-se fundamental em sua classificação: a produção de uma toxina semelhante à toxina produzida pela *Shigella dysenteriae*, a shiga-like toxina, também denominada verotoxina. Em *Shigella*, o gene que codifica tais toxinas é cromossômico, enquanto na EHEC pode ser transmitido por bacteriófagos (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002).

PATON & PATON (1998) descrevem a ocorrência de dois principais grupos antigênicos destas toxinas: Stx1 (VT-I) e Stx2 (VT-II). Curiosamente as células epiteliais do intestino humano são parcialmente resistentes á ação citotóxica de Stx, entretanto a toxina é capaz de atravessar o epitélio intestinal e alcançar células do endotélio de vasos que suprem o intestino, o rim, pâncreas e outras vísceras como cérebro e coração. A série de eventos, a partir desta lesão vascular, pode resultar em coagulação intravascular, que por sua vez resulta em trombocitopenia, micro angiopatia, anemia hemolítica, com hemólise e conseqüente falência renal, caracterizando a síndrome clássica da HUS (síndrome hemolítica urêmica) (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002).

Existem poucos dados a respeito da ocorrência em cães e gatos, KRAUSE et al (2005) analisaram a ocorrência de cepas causadoras de lesões “attaching-effacing” em várias espécies de animais domésticos encontrando menores prevalências entre cães (7,2%) e gatos (6,5%). SANCAK et al (2004) encontraram maior ocorrência de genes *eae*, codificadores de lesões do tipo A/E e de genes codificadores para verocitotoxina entre os cães diarréicos que entre os saudáveis, enquanto PAULA (2007) relata a ocorrência de STEC em 23% de cepas de *E. coli* isoladas de cães diarréicos. BUSCH et al (2007) relataram um caso de diarréia sanguinolenta em uma criança de 2 anos causada por uma cepa STEC, tendo isolado uma cepa idêntica de seu gato assintomático.

2.2.6 - *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Infecções por EIEC ocorrem em humanos de todas as idades, sendo mais comum em países menos desenvolvidos (ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002). A principal patologia consiste na inflamação e erosão da mucosa, principalmente no intestino grosso. Há uma íntima penetração da bactéria na mucosa, ao contrário do que acontece nas infecções por ETEC, e a ulceração da mucosa é conseqüência desta penetração.

A penetração dos enterócitos não se dá pelo lúmem e sim através das células M, que são as principais constituintes do tecido que circunda o folículo linfóide. Conseguem evitar a fagocitose após penetrar no epitélio por induzir apoptose nos macrófagos. NATARO & KAPER (1998) consideraram o mecanismo causador da diarréia pouco conhecido e supõem o envolvimento de enterotoxinas codificadas por plasmídeos. NAVANEETHAN & RALPH (2008), atribuem aos patógenos invasivos (como EIEC) a capacidade de produzir citotoxinas além de desencadearem reação inflamatória aguda, ativando citoquininas e mediadores inflamatórios, o que poderia explicar a diarréia.

Estas cepas estão estreitamente relacionadas com *Shigella,* com a qual compartilham vários fatores de virulência. Tais fatores estão codificados por genes encontrados em um grande plasmídeo, formado por aproximadamente 220kb (SASAKAWA et al, 1992). Entre os genes encontrados neste plasmídeo estão os que codificam as proteínas do sistema de secreção III, responsáveis por eventos de sinalização, rearranjo do citoesqueleto, lise do vacúolo endocítico, entre outras ações (KAPER et al, 2004). Apresentam ainda outros fatores de virulência como sistema de captação do ferro e proteases, entre elas a serina protease.

PASS et al (2000) isolaram genes *Einv* (responsáveis pela invasão da mucosa) em cães com diarréia, mas não relataram registro de cepas EIEC em cães até o presente momento.

2.2.7 - *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Apresenta distribuição epidemiológica semelhante à ETEC, acometendo principalmente crianças de países em desenvolvimento e viajantes destas áreas. Também está relacionada à síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) associada à diarréia (THEA et al, 1993 e MAYER et al, 1995). Caracteriza-se por causar uma diarréia persistente, sendo observadas inflamação e mudanças citotóxicas em células do intestino. São vários os fatores de virulência associados à EAEC, e complexos mecanismos interagem com as defesas do hospedeiro determinando ou não o surgimento de sintomas. Nem todas as cepas causam diarréia em humanos (DAVID et al, 2003). REGUA-MANGIA et al (2009) pesquisaram a resistência a antimicrobianos em cepas de EAEC provenientes de crianças com e sem diarréia no Rio de Janeiro e também não encontraram associação significativa quanto à resistência nos dois grupos, e embora tenham encontrado mais EAEC nas cepas provenientes de crianças com diarréia, estatisticamente não foi constatada diferença em relação ao grupo controle, corroborando com o conhecimento prévio sobre a relação de EAEC com diarréia.

A adesão destas bactérias deve-se à presença de fímbrias de aderência agregativa (AAFs) (CZECZULIN et al, 1999). KAPER et al (2004) relataram a presença de uma proteína, a dispersina, que está associada ao efeito agregativo das AAFs.

Na patogênese de EAEC estão envolvidos três estágios: aderência por meio das fímbrias, formação de biofilme pelo aumento da produção de muco pelas células intestinais induzida pela presença da bactéria e de suas toxinas e processo inflamatório que causam lesões na mucosa (NATARO & KAPER, 1998).

Estudos relatam a ocorrência de cepas EAEC em indivíduos com diarréia em países desenvolvidos. É, portanto, considerada um patógeno emergente que ocorre tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos, tendo ocorrido surtos no Japão, em 1993; no Reino Unido, em 1994. HUPPERTZ

et al (1997) encontraram uma prevalência de 2% de cepas EAEC em crianças com diarréia na Alemanha.

2.2.8 - *E. coli* difusoaderente (DAEC)

Está relacionada com diarréia em crianças com mais de um ano de idade (KAPER et al, 2004). Cultivadas em células Hep-2 e HeLa apresentam um padrão característico de aderência difusa. Esta aderência é mediada por fímbrias (F1845) e codificada por genes localizados no cromossomo ou em plasmídeos (NATARO et al, 1996).

Cepas DAEC apresentam adesinas da família designada como Dr, que são estruturas localizadas na superfície celular e estão envolvidas na transdução de sinais para a célula hospedeira que culminam com rearranjo do citoesqueleto levando aos danos celulares. Ligam-se ao DAF ("Decay Accelerating Factor") ou CD55, proteína da membrana que regula o sistema de complemento na superfície. Esta ligação torna a célula vulnerável ao efeito cascata por permitir a ligação do complemento C3bBb (KAPER et al, 2004).

Não foram encontrados trabalhos relacionando DAEC com diarréia em animais.

2.2.9 - *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC)

São cepas caracterizadas por causar doenças em outros sítios corporais que não o intestinal. Sob este acrônimo estão reunidas as cepas uropatogênicas (causam infecção no trato urinário), também chamadas UPEC (Uropathogenic *E. coli*); as cepas associadas à sepse e as associadas à meningite neonatal, portanto capazes de colonizar e produzir doença nos mais variados sítios anatômicos (RUSSO & JOHNSON, 2000; KAPER et al, 2004).

SMITH et al (2007) relataram a prevalência de 20% de cepas ExPEC no intestino de pessoas saudáveis. São filogeneticamente e epidemiologicamente

distintas das cepas comensais e patogênicas intestinais e podem colonizar o intestino assintomaticamente.

As cepas UPEC estão entre as principais causas de infecções do trato urinário (ITU) adquiridas na comunidade (70-95%) e participam em 50% das ITU nosocomiais (FOXMAN, 2003). Podem ocorrer surtos de ITU por UPEC através de alimento contaminado, também é relatada a transmissão por contato sexual (MANGES et al., 2001; FOXMAN et al., 2002; JOHNSON & DELAVARI, 2002).

WILES et al (2008) concluem que UPEC assim como outras ExPEC desenvolveram múltiplos e redundantes mecanismos para superar os desafios encontrados no organismo do hospedeiro e que sua patogenicidade é mais resultado da interação de vários fatores de virulência do que da ação específica de um ou outro fator.

Dentre os vários fatores que possibilitam a colonização e/ou invasão dos tecidos do hospedeiro e a evasão do sistema imune, podem ser citados: adesinas, invasinas, toxinas, sideróforos e evasinas. Tais fatores de virulência podem ser encontrados em plasmídeos ou ilhas de patogenicidade (BOWER et al, 2005).

Cepas fecais de cães têm sido referidas como importantes reservatórios de *E. coli* causadoras de infecção do trato urinário em humanos (JOHNSON et al, 2001). LISTER et al (2009) encontraram cepas UPEC em urina de gatos sem sintomas de ITU, porém com urinálise sugestiva de infecção urinária, concluindo que ITU bacteriana em gatos pode ocorrer sem sinais clínicos de infecção.

2. 3 - A microbiota intestinal de gatos

A composição da flora intestinal de felinos é ainda muito pouco conhecida, apesar de tal conhecimento ser relevante tanto para a medicina veterinária quanto para a saúde pública. Cepas com potencial zoonótico e/ou resistentes a antibióticos podem estar presentes na microbiota representando riscos para a comunidade (LEENER et al, 2005; MOYAERT et al, 2006).

Alguns micro-organismos da flora são de difícil identificação usando-se técnicas tradicionais como a cultura, e muitas vezes o conhecimento é baseado apenas nas espécies mais facilmente cultivadas em laboratório ou naquelas que apresentam maior interesse para a comunidade científica.

A maioria dos conhecimentos sobre a microflora vem do estudo da flora em humanos (RASTALL et al, 2004). Existem muitos estudos a respeito da flora de grandes e pequenos ruminantes, porém, este assunto é pouco estudado em relação aos animais monogástricos, em particular os animais de companhia.

Importantes conclusões podem ser tiradas a partir de um melhor conhecimento da ecologia da microbiota tornando possíveis novas abordagens terapêuticas, inclusive para doenças ainda não diretamente relacionadas ao trato intestinal (AZIS, 2009).

A partir do nascimento, o intestino estéril de mamíferos é rapidamente colonizado por bactérias provenientes da mãe e do ambiente e, após seu estabelecimento a flora se mantém relativamente estável. Porções diferentes do trato intestinal têm diferentes micro-organismos, principalmente devido às diferenças de pH. Sendo assim, nas porções iniciais do intestino delgado predominam lactobacilos, estreptococos, enterobactérias, *Bifidobacterium spp*, *Bacteroides spp* e clostrídios, apresentando aproximadamente 10^4–10^8 UFC/ml. No intestino grosso, região mais densamente colonizada existe de 10^{11}–10^{12} UFC/ml. Predominam os anaeróbios restritos como os *Bacteroides spp*, clostrídios*, Ruminococcus spp., Butyrovibrio spp., Fusobacterium spp., Eubacterium spp., Peptostreptococcus, Bifidobacterium spp., Atopobium spp.,* e *Peptococci.* Entre os anaeróbios facultativos incluem-se os lactobacilos, enterococos, estreptococos, e espécies da família Enterobacteriacea, entre estas a *E.coli*. Leveduras estão presentes em número relativamente pequeno.

A composição da microbiota varia entre as espécies e entre indivíduos da mesma espécie parecendo haver uma forte correlação com a constituição genética, o que foi bem evidenciado por TOIVANEN et al (2001) demonstrando a

influência do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) na composição da microflora fecal.

FRANK & PACE (2008) usaram avançados métodos de análise de DNA no estudo da ecologia da flora intestinal humana e encontraram uma grande variedade de micro-organismos (cerca de 40.000 espécies diferentes). Relacionaram, ainda, doença de Crohn, colite ulcerativa, diarréia associada à antibioticoterapia e obesidade com mudanças significativas na composição desta flora.

DESAI et al (2009) conduziram um interessante estudo sobre a composição da flora intestinal de gatos usando métodos moleculares baseados na identificação do gene *cnp*-60. Encontraram grande similaridade entre o perfil taxonômico da flora desta espécie com a de outros mamíferos, inclusive com a humana. Constataram, porém, variação individual na abundância de cada espécie. Assim como nos estudos conduzidos com outros mamíferos, há o predomínio de firmiculites, categoria a qual pertencem os lactobacilos e clostrídios (LEY et al, 2008). Gatos criados livres, com acesso irrestrito ao ambiente externo e, portanto com dieta não controlada, que se alimentam também através da caça, apresentaram uma maior proporção de Lactobacilos, particularmente *L. ruminis* em relação aos gatos vivendo exclusivamente no interior de residências. Actinobactérias, dentre estas especialmente *Bifidobacterium sp* também foram largamente encontradas. A maior diversidade de espécies encontradas foi entre Bacteriodetes e Proteobactérias.

A *E. coli* está entre os principais micro-organismos anaeróbios facultativos constituintes da flora normal de animais de sangue quente, podendo ocorrer na proporção de 10^{7} a 10^{9} micro-organismos por grama de fezes. Entre os animais domésticos, os cães e gatos são os que apresentam o maior número de *E. coli* por grama de fezes (GYLES & FAIRBROTHER, 2004). Cepas patogênicas de *E.coli* também têm sido encontradas tanto na flora de gatos saudáveis (MOYAERT et al, 2006; BUSCH et al, 2007; MORATO et al, 2008) como na de gatos diarréicos

(ABAAS et al, 1989; POPISCHIL et al, 1987; FREITAG et al, 2004; FRÖLICHER et al, 2008).

2.4 - A diarréia em gatos

A diarréia é definida como o trânsito de fezes com quantidades anormais de água resultando no aumento e liquidez destas. Pode ser aguda ou crônica, acometendo gatos de todas as idades (ETTINGER & FELDMAN, 2004).

Vários fatores etiológicos estão envolvidos, como por exemplo: alimentação, presença de parasitas intestinais, vírus, bactérias, protozoários. Pode estar relacionada a doenças de outros sistemas corpóreos, refletindo desequilíbrios metabólicos, como acontece nas uremias pelas mais diversas causas, na pancreatite, em algumas afecções hepáticas e tumores, entre outras. Medicamentos como antibióticos e antiinflamatórios também podem causar diarréia (BURROWS, 1991).

Diarréias crônicas estão mais relacionadas a distúrbios metabólicos e imunológicos, parasitas intestinais (vermes e protozoários), dieta inadequada, vírus da imunodeficiência felina, vírus da panleucopenia, vírus da leucemia felina e algumas bactérias como *Salmonella sp, Campylobacter jejuni* e *Clostridium sp* (GREENE, 1984).

A diarréia aguda é uma desordem clínica comum em gatos, estando principalmente associada a agentes infecciosos, que podem ser vírus (principalmente coronavírus e rotavírus) e bactérias. A etiologia bacteriana é pouco reconhecida nestes animais, sendo *Salmonela sp, Campylobacter jejuni, Bacillus piliformes*, *Clostridium perfringens* enterotoxigênico e, recentemente a *Escherichia coli*, as espécies mais citadas (SMITH et al, 1998; BEUTIN, 1999, SANCAK et al, 2004).

E. coli enteropatogênica exibindo o fenótipo “attaching and effacing” foi relatada em gatos (POPISCHIL et al, 1987). ABAAS et al (1989) encontraram uma prevalência de 12,3% de cepas VTEC (*E.coli* verocitotoxigênica) em amostras

fecais que não puderam associar à diarréia, pois não houve diferença significativa em relação à presença destas cepas nos gatos sem diarréia. MORATO et al (2008) demonstraram que gatos podem ser colonizados por cepas EPEC, tendo encontrado alta prevalência destas cepas nestes animais. No trabalho anteriormente mencionado foram encontrados 12 sorotipos diferentes, entre estes, dois sorotipos já descritos como patógenos de humanos (O111: H25 e O125: H6), demonstrando que gatos domésticos podem ser reservatórios de cepas patogênicas para a comunidade. Sugeriram ainda que é possível um ciclo de mútua infecção por EPEC entre gatos e humanos, embora a dinâmica deste ciclo ainda não esteja esclarecida.

2.5 - O trato urinário de gatos e as infecções urinárias

A bactéria *E. coli* é o agente etiológico da maioria das infecções do trato urinário (ITU), patologias infecciosas muito freqüentes na clínica de pequenos animais. Ao lado de gatos e cães, os seres humanos apresentam alta prevalência de ITU causada por este micro-organismo (DONNENBERG & RODNEY, 1996; CORREIA ou et al, 2007).

A verificação de cepas de *E. coli* de origem animal em isolados de cistite de humanos chamam a atenção para o potencial zoonótico desta bactéria (ABAAS et al, 1989; JOHNSON et al, 2000 e 2001).

O sistema urinário de felinos, como o dos mamíferos em geral, é composto pelos rins, ureteres, bexiga e uretra. Uma das principais funções do sistema urinário é manter o equilíbrio químico do organismo, promovendo a homeostasia através da remoção dos resíduos do metabolismo orgânico e da regulação do equilíbrio ácido-básico. Também apresenta função endócrina com a produção de eritropoietina, renina, angiotensina e participa na conversão da vitamina D (CUNNINGHAM, 1997; CONFER & PANCIERA, 1998).

A função renal, e consequentemente a homeostasia do organismo, pode ser profundamente prejudicada devido às afecções que acometem o trato urinário,

gerando retenção de resíduos nitrogenados do metabolismo (azotemia), desequilíbrio hidroeletrolítico e ácido–básico, e em longo prazo uremia, hiperparatireoidismo e osteodistrofias (CONFER & PANCIERA, 1998).

Os processos infecciosos do sistema urinário geralmente se iniciam na uretra ou na bexiga e por via ascendente podem acometer ureteres e rins ou atingir a corrente sanguínea. A cistite se desenvolve quando os mecanismos de defesa falham em combater agentes como bactérias e vírus capazes de aderir, multiplicar e persistir em uma porção do trato urinário (CONFER & PANCIERA, 1998; BARTGES, 2004).

Dentre as infecções urinárias bacterianas, as causadas por *E.coli* desempenham um papel importante, sendo responsáveis por severas síndromes que podem culminar com a morte do animal. Embora a prevalência de infecção do trato urinário seja maior para cães (14%) (POLZIN, 1997), a ITU bacteriana em gatos é muito mais significativa, manifestando-se de forma mais severa (KRUGER et al, 1991).

As infecções bacterianas das vias urinárias não são muito freqüentes em felinos, sendo que freqüência de isolamento de bactérias a partir da urina de gatos com sintomas de cistite pode variar entre 8 e 25%. O menor percentual é verificado entre gatos que apresentam apenas doenças do trato urinário como causa primária, e o maior, quando são incluídos no estudo tanto gatos com patologias urinárias primárias quanto aqueles com outras doenças tais como diabetes Mellitus, hipertireoidismos e insuficiência renal crônica (KRUGER et al, 1991, RECHE JUNIOR & HAGIWARA, 1998).

Baixas prevalências de infecção bacteriana em felinos com doenças do trato urinário refletem as características do sistema urinário destes animais que apresentam urina com alta densidade (superior a 1.080), pH naturalmente ácido e elevada concentração de uréia (OSBORNE et al, 1979; OSBORNE & STEVENS, 1989). A perda de um ou mais destes mecanismos de defesa pode predispor o gato às cistites bacterianas (RECHE JUNIOR et al, 2005).

Em felinos as infecções urinárias ocorrem prevalentemente em animais idosos, acima de 10 anos, e em geral, submetidos a procedimentos cirúrgicos. Um dos fatores predisponentes são as obstruções do trato urinário, muito comuns em machos castrados, e relacionados ao tipo de alimentação que predispõe à formação de cálculos urinários. Procedimentos como, por exemplo, as sondagens uretrais para a desobstrução propiciam a instalação de agentes infecciosos. Fêmeas são naturalmente mais suscetíveis devido à proximidade da uretra com o ânus, o que facilita a ascensão de agentes bacterianos às vias urinárias (OSBORNE et al, 1979; OSBORNE & STEVENS, 1989).

Os sinais clínicos das infecções do trato urinário inferior (uretra e bexiga) são: polaciúria, estrangúria ou disúria, dor à palpação abdominal, turvação da urina e/ou hematúria. As infecções do trato urinário superior (ureteres e rins) causam geralmente manifestações mais severas, como anorexia, letargia, pirexia, hematúria, septicemia e falência renal. Infecções assintomáticas também podem ocorrer (BARTGES, 2004; POLZIN, 1994).

2.6 - Fatores de virulência

Os fatores de virulência podem ser considerados como estratégias adotadas pelos micro-organismos para vencer as barreiras imunológicas do hospedeiro e permitir a sua colonização. Embora, do ponto de vista evolutivo, seja mais vantajosa uma relação harmoniosa, por garantir ao micro-organismo alimento e abrigo através da preservação do hospedeiro, esta nem sempre se estabelece e, como conseqüência, o organismo colonizado passa a apresentar desordens ou alterações patológicas que podem culminar com sua morte.

A uropatogenicidade em *E. coli* deve-se principalmente a dois mecanismos: adesão e citotoxidade. A adesão permite a fixação da bactéria à superfície do epitélio do hospedeiro vencendo as forças hidrodinâmicas representadas pelo fluxo de urina (ROSS et al, 1999). A aderência deve-se ao reconhecimento específico entre o micro-organismo e as células do animal infectado e é mediada

por estruturas protéicas, as adesinas, presentes na superfície da bactéria. Estas estruturas podem ser fimbriais ou afimbriais, conforme se caracterizem como organelas filamentosas ou moléculas ancoradas na parede celular bacteriana respectivamente (JOHNSON, 1991).

As ExPEC podem apresentar quatro diferentes tipos de fímbrias: fímbria P, fímbria tipo 1, fímbria S e Afa. Fímbrias tipo 1 são encontradas em diversas espécies bacterianas patogênicas e comensais, e têm sido associadas à infecções urinárias de homem e de animais (BOWER et al, 2005). Ligam-se à proteínas como as uroplaquinas, abundantes na bexiga. Também existem receptores para estas fímbrias nos túbulos proximais e paredes de vasos (rins), em camadas musculares da bexiga e vasos sanguíneos (JOHNSON, 1991)

As fímbrias são classificadas quanto à sua capacidade hemaglutinante em presença e ausência de D-manose. Segundo ORSKOV et al (1982) a variação na seqüência de peptídios codificados pelo gene *pap*A é responsável pela existência de 11 variantes sorológicas para fímbrias. Baseado na atividade hemaglutinante as fímbrias de *E. coli* foram classificadas em três categorias: fímbrias não hemaglutinantes (por exemplo, a fímbria 987 P); fímbrias cuja aglutinação é inibida pela D-manose, (manose sensíveis: HAMS ou fímbria tipo 1) e as fímbrias que não tem a hemaglutinação inibida pela manose, (manose resistente: HAMR) (MORRIS, 1983). As fímbrias HAMS são comumente encontradas em diferentes enterobactérias. A fímbria P é o principal grupo das hemaglutininas manose resistente associadas às infecções urinárias (BLANCO & BLANCO, 1993). LUND et al (1988) citam as fímbria tipo 1, P, M e S em amostras de *E. coli* isoladas de humanos com pielonefrites. As fímbrias também podem ser agrupadas segundo sua especificidade sorológica em grupos F (DE REE et al, 1985). Apesar da diferença antigênica, os diferentes tipos de pili P reconhecem o mesmo receptor: Gal - (1, α-D 4) - β - D - Gal presentes em hemácias do grupo sangüíneo P e células uroepiteliais (LUND et al, 1988).

Determinadas cepas de *E. coli* produzem toxinas protéicas que desempenham importante papel em sua virulência tais como: a hemolisina, a

colicina (bacteriocina), a enterotoxina termolábil (LT); a enterotoxina termoestável (ST); a verotoxina ou "Shiga-Like" toxina (VT ou SLT) e o fator necrosante citotóxico (CNF) (GYLES, 1992).

A produção de hemolisina é muito freqüente em cepas provenientes de infecções do trato urinário de humanos (VIDOTTO et al, 1991). A presença deste fenótipo como marcador de clones virulentos foi utilizada por vários autores como indicadores de patogenicidade (VAN DEN BOSCH et al, 1982 e BRITO et al, 1999).

Duas formas de sideróforos estão presentes na *E. coli:* a enterobactina e a aerobactina. Segundo JOHNSON (1991), os genes codificadores da enzima responsável pela síntese de aerobactina podem estar situados em plasmídios e cromossomos e têm sua expressão regulada pela concentração intracelular de ferro, através do gene cromossomal *fur*. A capacidade de provocar hemólise (hemolisina) e a captação aumentada de ferro (aerobactina) são características relacionadas como a disponibilidade do ferro e de sua utilização para o crescimento bacteriano (BLANCO & BLANCO, 1993).

Colicinas são bacteriocinas produzidas pela *E. coli* que têm ação letal sobre espécies de micro-organismos sensíveis. As principais são: A, B, E_1, D, Ic, Ib, K, N, V. Os plasmídios que codificam a produção de colicina V geralmente apresentam alta massa molecular e podem carrear outros fatores de virulência (SMITH, 1974). A colicina V inibe o crescimento bacteriano (YANG & KONSKY, 1984). Segundo VIDOTTO et al, 1991, a atividade colicinogênica das amostras de *E. coli* isoladas da urina de humanos é variável, e embora a expressão deste plasmídio não seja essencial para a patogenicidade da *E. coli*, pode carrear outros fatores de virulência, tais como: inibição da fagocitose por macrófagos, aerobactina, resistência sérica e o antígeno K1 (BLANCO & BLANCO, 1993*).*

A capacidade de a bactéria resistir à atividade lítica do soro está relacionada aos antígenos K1 e K5, à quantidade de lipopolissacarídeos e às proteínas da membrana (TIMMIS et al., 1981). Foi observado por HUGHES et al (1982) que amostras de *E. coli* uropatogênicas em humanos resistiram ao soro.

BLANCO & BLANCO (1993) citam esta capacidade em estudos com bovinos, enquanto BRITO et al (1999) verificaram a resistência sérica em 93% das cepas uropatogênicas isoladas de suínos. Os antígenos capsulares envolvidos neste processo são de baixa imunogenicidade e apresentam atuação anti fagocítica (DEVINE & ROBERTS, 1994).

As toxinas termoestáveis (ST) foram identificadas pela primeira vez em 1967, por SMITH & HALLS quando verificaram a presença de uma proteína (toxina) secretada pela *E. coli* responsável pelo acúmulo de líquido nas alças intestinais de coelhos e suínos. GYLES & BARNUM (1969) já haviam identificado outra toxina com atividade semelhante implicada em diarréia de suínos, porém inativadas em temperaturas superiores a 65°C e, portanto denominadas termolábeis.

As toxinas termoestáveis são de dois tipos: STa , solúvel em metanol, de baixo peso molecular e ativa no intestino de camundongo neonato; e STb, insolúvel em metanol, inativa em camundongo neonato, porém ativa no intestino de leitões desmamados (BURGESS et al,1978). A enterotoxina LT é uma molécula protéica de alto peso molecular, imunogênica, que apresenta duas subunidades: A e B. A subunidade A representa o componente ativo e a subunidade B é responsável pela fixação da toxina aos gangliosídeos da membrana da célula do hospedeiro (SUSSMAN, 1985)

No mecanismo de ação da toxina LT não ocorre um dano estrutural em nível celular, mas sim o bloqueio de suas funções e, por este motivo sua denominação correta é citotonina, para diferenciá-la das citotoxinas.

As verotoxinas são exotoxinas que causam efeito citotóxico caracterizado por arredondamento celular, morte e deslocamento do tapete de células (KONOWALCHUK et al, 1977). Estas toxinas se classificam em dois tipos: Stx1 e Stx2, que são sorologicamente distintas e apresentam efeito citotóxico em células VERO e células de adenoma de útero humano (HeLa) (RYCKE et al., 1989). As verotoxinas inibem a síntese proteica por inativação catalítica da subunidade ribossomal 60S (GYLES, 1992).

O fator necrosante citotóxico (CNF) é uma toxina que impede a divisão celular sem afetar a replicação dos ácidos nucléicos. Sua produção tem sido detectada em cepas de *E. coli* de infecções extra intestinais (CAPRIOLI et al., 1983). Correlação positiva, entre atividade hemolítica e produção de toxina (CNF) em amostras de *E. coli* foi encontrada por BLANCO et al. (1992).

2.7 - Antimicrobianos

A aceitação da teoria microbiana, e com ela, a idéia de que através da eliminação do micro-organismo infectante seria possível o combate eficiente às doenças infecciosas, levou o homem à procura de substâncias capazes de matar ou inibir o crescimento e/ou reprodução de micro-organismos. Estes esforços levaram inicialmente ao uso de arsenicais como o “salvarasam” que eram denominadas pílulas mágicas por atuarem no combate à sífilis e tripanossomíases, porém tinham que ser usadas por longo tempo e traziam sérios efeitos colaterais (WRIGHT, 2007).

A busca por drogas mais eficazes e com menos efeitos colaterais incrementou as pesquisas de antimicrobianos, grande grupo de substâncias que incluem os antibióticos e os quimioterápicos. No sentido restrito do termo, antibióticos referem-se à substâncias produzidas por micro-organismos que tem a capacidade de, em pequenas doses, inibir o crescimento ou destruir micro-organismos causadores de doenças, enquanto quimioterápicos são substâncias químicas sintetizadas artificialmente. Em 1932, as sulfas foram produzidas comercialmente, dando origem a quimioterapia antimicrobiana, no entanto, foi a penicilina, substância naturalmente produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum* (ou *P. notatum*) e descoberta acidentalmente por Alexandre Fleming, em 1928, o primeiro antibiótico no sentido estrito do termo. Sua produção em escala comercial somente aconteceu a partir de 1941, tornando possível o tratamento de várias doenças anteriormente tidas como incuráveis (WRIGHT, 2007).

O período a seguir (1945 a 1960) pode ser considerado como a “era de ouro da descoberta do antibiótico”, e a maior parte das classes de antimicrobianos atualmente em uso foram sintetizadas nesta época, como por exemplo, a estreptomicina, primeiro antibiótico aminoglicosídeo conhecido, descoberto a partir da Actinobactéria *Streptomyces griseus*, em seguida vieram as tetraciclinas, o cloranfenicol, a polimixina, a eritromicina, a vancomicina, a virginamicina e a rifamicina, entre outros. O período seguinte caracterizou-se por um intenso trabalho de melhoramento das moléculas já existentes, para potencializar sua ação farmacológica e evadir a resistência bacteriana, fenômeno que já se notava desde os primeiros usos de antibióticos (WRIGHT, 2007).

2.7.1 - Principais classes de antimicrobianos e mecanismos de ação

Quanto à classificação dos antimicrobianos com base nos seus mecanismos de ação, PELCZAR Jr. et al (1997); LOMAR e DIAMENT (1998); JAWETZ et al (1998) e TAVARES (2001) consideraram o seguinte:

2.7.1.1 - Inibidores da síntese da parede celular: Antibióticos *B*-lactâmicos (penicilina e cefalosporinas)

Contêm um anel ativo, o anel betalactâmico, núcleo comum a todos e uma região que varia conforme o subtipo. São derivados da polimerização de aminoácidos e inibem a síntese de peptidoglicano, componente básico da parede celular causando dano irreversível. Acoplam-se ao receptor desta parede e interferem com a transpeptidação que ancora o peptidoglicano estrutural de forma rígida em volta da bactéria. Há o impedimento da formação das ligações entre os tetrapeptídeos de cadeias adjacentes de peptideoglicano ocasionando uma perda da rigidez da parede celular.

São bactericidas que atuam sobre células em crescimento, portanto inativas na fase estacionária e em células que não possuem parede celular, tais como micobactérias, bactérias em forma de L e protoplastos que regeneram a parede celular.

Existem diferentes receptores celulares do tipo BPF na membrana e também uma variedade de betalactâmicos, de forma que cada um deles tem uma ação específica:

O grupo das penicilinas, ampicilinas e cefalosporinas inibem a enzima envolvida na transpeptidação, responsável pela ligação entre as cadeias de tetrapeptídeos do peptideoglicano; as bacitracinas interferem com o carreador lipídico que transporta os precursores da parede pela membrana e as vancomicinas ligam-se diretamente à porção lipídica do peptideoglicano.

2.7.1.2 - Inibidores da síntese protéica

Os antimicrobianos que inibem a síntese protéica podem fazê-lo por atuação em diversos sítios do ribossomo.

Grupo das tetraciclinas: São inibidores específicos da síntese protéica no ribossomo bacteriano. Bloqueiam o receptor na subunidade 30S que se liga ao t-RNA durante a tradução gênica não permitindo a ligação do peptídeo - tRNA ao sitio A. Sua ação é reversível e, por isso são agentes bacteriostáticos**.** Caracterizam-se por apresentar amplo espectro de ação, sendo efetivos contra uma grande variedade de micro-organismos Gram negativos, Gram positivos, ricketsias, micoplasmas e clamídeos.

Grupo dos aminoglicosídeos: Atua também por ligação à porção 30S do ribossomo, mas o mecanismo de ação difere em relação ao grupo das tetraciclinas. Dois mecanismos estão envolvidos, o primeiro consiste no impedimento da leitura correta do RNA mensageiro e a síntese da proteína correspondente; o segundo atua por impedimento da translocação do peptídeo- t-RNA do sítio A ao sítio P do ribossomo. São considerados aminoglicosídeos os seguintes antibióticos: amicacina, gentamicina, tobramicina, estreptomicina entre outros.

Grupo dos macrolídeos: Quanto à atuação os macrolídeos se dividem em dois grupos, aqueles capazes de inibir a síntese protéica através da ligação à subunidade 50S do ribossomo bacteriano, e daqueles que atuam sobre fungos e protozoários através da indução de distorções em suas membranas celulares por

interferir com os esteróis. Eritromicina, espiramicina, oleandomicina e leucomicinas são exemplos de macrolídeos bactericidas, enquanto anfotericina B age sobre os esteróis atuando sobre fungos.

O cloranfenicol também atua na a inibição da síntese protéica, porém não pode ser enquadrado em nenhuma das classes. Este antibiótico age por uma mistura de mecanismos e seu sítio de ação é também a unidade 50S do ribossomo. São ativos contra Gram negativos e Gram positivos, foi o primeiro a exibir atividade contra ricketsias.

2.7.1.3 - Inibidores da replicação e transcrição do ácido nucléico

Atuam por inibição da síntese de ácidos nucléicos de variadas formas. A novobiocina impede a replicação do DNA por afetar seu desenovelamento. Quinolonas inibem a DNA girase, afetando a replicação, transcrição e reparo. O ácido nalidíxico foi a primeira quinolona de ação clínica, sintetizada em 1962. Outras quinolonas foram sintetizadas como o ácido oxilônico e o cinoxino e, na década de 80, as fluorquinolonas. As primeiras quinolonas sintetizadas são chamadas de 1º geração e têm espectro de ação menor em relação às demais.

Ansamicinas, como por exemplo, a rifamicina inibem a enzima RNA polimerase impedindo a transcrição.

2.7.1.4 - Inibidores das funções das membranas celulares

Entre estes estão as polimixinas e os ionóforos. As primeiras agem como detergentes, ligam-se à membrana, entre os fosfolipídios alterando sua permeabilidade. São muito eficazes contra Gram negativo. Os ionóforos penetram na membrana plasmática permitindo a difusão passiva de compostos ionizados para dentro e fora da célula.

2.7.1.5 - Antimetabólicos

Refere-se a um grupo de sustâncias naturais ou sintéticas com estruturas e mecanismos de ação heterogêneos, que inibem e antagonizam metabólitos. Geralmente, mas não sempre, suas estruturas químicas são análogas à daqueles metabólitos que antagonizam. A inibição é competitiva e depende do grau de afinidade entre a enzima do análogo e do metabólito natural. Podem ser

incorporados à polímeros como DNA, RNA e proteínas, resultando em alterações de informação. Também podem ser inibidores seletivos da transcriptase reversa, sendo geralmente utilizados contra o HIV. Um segundo grupo é dos que inibem a formação de metabólitos ou cofatores essenciais, como é o caso das sulfonamidas na interferência com o ácido fólico.

2.8 - Considerações sobre a resistência microbiana

A resistência bacteriana à antimicrobianos, particularmente a multiresistência, é um sério problema de saúde pública. Ao lado do aumento de sua freqüência e severidade, o desenvolvimento de novos agentes antinfecciosos pelas principais companhias farmacêuticas tem diminuído. Isto agrava os efeitos da resistência, tornando-a um dos maiores desafios ao controle das infecções em serviços de saúde. A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) através da AATF (“Antimicrobial Avaiability Task Force”) declara urgência em pesquisas por novas drogas e no topo de sua lista de prioridades está a descoberta de novos quimioterápicos contra *E. coli* e *Klebsiella* com resistência do tipo ESBL, *Enterococcus faecium* vancomicina resistentes, *Staphilococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, espécies de *Aspergilus* e *Acinetobacter baumannii,* por serem patógenos que representam atualmente alto risco para a comunidade (TALBOT et al, 2006)

Porém, de fundamental importância, ao lado dos esforços na busca de novas drogas, é o uso racional das já existentes. Essa realidade pressupõe a necessidade de estudos continuados de sensibilidade bacteriana, especialmente para *E. coli,* visando aperfeiçoar os protocolos terapêuticos e investigar a ocorrência de linhagens multiresistentes em virtude da possibilidade de transmissão cruzada entre homens e outros animais (SIQUEIRA et al, 2008).

A resistência, longe de ser um fenômeno recente, foi relatada antes mesmo do primeiro uso clínico de antibióticos e, apesar de fortemente relacionada à pressão de seleção pelo uso destes, tem ainda causas intrínsecas ao micro-

organismo ou relacionadas à sua adaptação ao ambiente. A grande variedade de genes envolvidos indica uma origem e evolução muito antigas (WRIGHT, 2007).

Desde os anos 50, quando começaram a emergir as multiresistências em escala mundial, a observação da facilidade com que certas bactérias a desenvolviam levou à constatação que estas características eram transferidas em taxas maiores que seriam se fossem geradas em cada linhagem bacteriana. Características na herança destes genes, como a proporção de bases G+C (diferente em relação ao restante do genoma da bactéria) e regiões adjacentes apresentando seqüências denotadoras de inserção (repetições, ou sítios conhecidos de inserção de integrons ou de fagos) podem atestar a origem estrangeira dos genes em questão (OCHMAN et al, 2000).

A evolução da resistência, e a multiresistência em particular, entre bactérias gram-negativas tem sido principalmente atribuída a elementos genéticos móveis e transferência horizontal de genes. Integrons têm representado um papel central na mobilização de uma variedade destes genes, e quanto maior a similaridade entre o códon de uso preferencial de integrons e o do organismo receptor mais facilmente ocorre a transferência horizontal. Integrons classe I têm sido descritos como os principais mobilizadores de resistência à antibióticos entre as bactérias entéricas e particularmente em *E. coli*. (DÍAZ-MEJÍA et al, 2008).

A presença de integron classe I em *E. coli* é estreitamente relacionada com ambientes ocupados/modificados pelo homem que parecem ser mais afetados pela pressão de seleção por antibióticos. Análises evolucionárias suportam esta idéia, mostrando múltiplas origens e aquisições de integrons por bactérias entéricas.

Tem sido observado que a prevalência de integron classe I cai à medida que se distancia de ambientes influenciados pelo homem. Presume-se que a pressão representada pela presença de antibióticos seleciona ou mantém integrons em *E. coli*. A presença de antibióticos pode selecionar alguns genes associados ao integron, como por exemplo, genes de resistência à sulfonamidas, e o códon de uso preferencial atuar como um facilitador da expressão de

integrases no genoma receptor promovendo sua retenção. Porém, cessada a pressão representada pelo antimicrobiano estes genes podem se perder facilmente, pois não há similaridade suficiente no códon de uso preferencial para tornar estável a presença destes genes no genoma (YU et al, 2004).

A análise bioinformática permitiu concluir que *E. coli* e outras enterobactérias têm adquirido e perdido integrases muitas vezes durante a evolução. É possível que cepas não clínicas de *E. coli* tenham capacidade reduzida de ganhar integron classe I, o que se infere a partir da observação que estas apresentam menos integrons em relação aos dos isolados clínicos, mas tal fato pode também ser atribuído à uma menor pressão de seleção destas em relação à das cepas clínicas. Cepas de *E. coli* comensal de animais silvestres também apresentam uma menor prevalência de integrons. Variações no tamanho dos insertos foram encontradas entre cepas ambientais e isolados clínicos, com menores variações encontradas para as cepas ambientais. Isolados de pessoas saudáveis não fazendo uso de antibióticos carregavam uma variedade estreita de cassetes: *dfr* ou *aadA* conferindo resistência a trimetropim e estreptomicina respectivamente, enquanto isolados clínicos hospitalares apresentaram sete diferentes tipos de determinantes de resistência. Destas observações e de outros estudos pode-se concluir que integrons em *E. coli* estão mais relacionados à ambientes modificados pelo homem e que antibióticos exercem uma pressão que seleciona ou mantém integrons nesta bactéria. Assim sendo, uma redução no uso de antibióticos pode levar a uma significante diminuição no carregamento de integrons entre cepas de *E. coli* (DÍAZ-MEJÍA et al, 2008).

GUARDABASSI et al (2004) citam vários estudos de resistência antimicrobiana em animais de companhia e associam o aumento do uso de antibióticos com o aumento da resistência. O registro sistemático do consumo de antibióticos não é pratica rotineira em vários países, fato que dificulta tal correlação, porém significativos estudos foram conduzidos em alguns países como Suíça e EUA abordando este aspecto.

A transmissão da resistência entre cepas de animais e humanos tem sido descrita, como também a transferência de resistência entre cepas comensais e patogênicas (SIMJEE et al., 2002; GUARDABASSI et al., 2004).

Com o aumento do conhecimento das bases genéticas da resistência a antimicrobianos, mais ênfase deve ser dada à resistência da flora normal. Estudos antigos vistos com o entendimento de elementos genéticos móveis tornam-se mais valiosos. E determinar quanto o desenvolvimento da resistência na flora normal está diretamente relacionado com o dramático aumento da resistência em patógenos só será possível com mais estudos sobre a resistência na microbiota. Antibióticos usados como aditivos alimentares em animais de produção têm sido relacionados com o surgimento de cepas resistentes da microbiota. Cepas de *E. coli* resistentes também têm sido isoladas da flora de animais de companhia (GUARDABASSI et al, 2004; MOYAERT et al, 2006).

Um tipo de resistência é particularmente importante, o de betalactamases de espectro ampliado (Extended Spectrum Betalactamas ou ESBL) em virtude de atuarem sobre antibióticos que estão entre os mais significativos para o tratamento das infecções bacterianas. ESBL são enzimas que conferem ampla resistência aos antimicrobianos que contém o anel betalactâmico em sua estrutura e agem neste anel, rompendo-o e inativando desta maneira o antibiótico. Sua produção é mediada por plasmídeos, e *Escherichia coli* e *Klebsiella Pneumoniae* são as espécies bacterianas que mais apresentam este tipo de resistência. A identificação destas enzimas tem aumentado consideravelmente, enquanto em 1970 eram conhecidas 13 betalactamases, atualmente são conhecidas mais de 500 betalactamases. A emergência de lactamases que podem inativar os mais novos betalactâmicos constitui um desafio, uma vez que praticamente qualquer betalactâmico pode ser inativado por uma das betalactamases já observadas. A maioria destas enzimas foi relatada em isolados clínicos humanos, particularmente em pacientes hospitalizados, embora tenham sido encontradas também em infecções da comunidade (SOUZA JUNIOR et al, 2004).

A prevalência de ESBL em *E. coli* depende da região geográfica, da instituição de saúde, da idade da população e de comorbidades (BELL et al, 1994; RAHMAN et al, 2004; BRIGANTE et al, 2005). Uma variedade de betalactamases tem sido identificada em bactérias de animais de produção ou de companhia. DOMINGOS et al (2009) relataram a expressão do fenótipo ESBL em *E. coli* isolada de cães sadios, assim como integrons classe I e II.

Agravando o problema, genes para ESBL geralmente coexistem com outros determinantes de resistência podendo estar associados com transposons e integrons, desta forma, bactérias produtoras de ESBLs são também resistentes à antibióticos não betalâctamicos com uma alta freqüência. Isto aumenta o potencial de multiresistência e a transferência horizontal, o que consequentemente aumenta a dificuldade de tratamento de infecções causadas por micro-organismos com estes fenótipos. A detecção de cepas ESBL em laboratórios de microbiologia apresenta algumas dificuldades e protocolos para esta detecção não são adotados nos antibiogramas de rotina, sendo desta forma subestimada a prevalência de ESBL (DALMARCO et al, 2006).

2.9 - Os animais de companhia nos dias atuais

Muito mais que animais, são atualmente considerados membros da família e geralmente têm acesso irrestrito à casa , principalmente os de raças menores. Tal proximidade implica em riscos de saúde para os proprietários, pois além das já conhecidas zoonoses, vários estudos sugerem a possibilidade de troca de organismos resistentes e/ou de seus genes entre animais e seres humanos (SIMJEE et al., 2002; GUARDABASSI et al., 2004).

Porém, ao lado dos riscos da disseminação de micro-organismos patogênicos e de genes de resistência, estão os relevantes benefícios que animais de estimação representam para quem os possui.

Segundo a Associação Nacional de Fabricantes de Alimentos para animais (ANFAL) está havendo grande aumento no número de animais de estimação.

Atualmente há cerca de 27 milhões de cães e 11 milhões de gatos (mantidos como animais de companhia) no Brasil. Embora haja uma prevalência no número de cães, atualmente tem aumentado o número de gatos, principalmente em grandes centros urbanos, devido a uma menor exigência destes animais em relação a espaço e também por serem de natureza mais independente, dispensando menos tempo de seus proprietários em seus cuidados.

O aumento de animais de estimação pode ser atribuído ao momento que a sociedade atravessa, onde o nível de estresse é muito alto devido à grande competição no mercado de trabalho e ao aumento da insegurança nas relações humanas, provocado tanto pelas profundas desigualdades sociais quanto por uma crise ética e moral que hora enfrentamos. Tudo isto resulta no aprofundamento da solidão e de medos que podem minar a alegria de viver (DIAS et al, 2004).

Os laços afetivos que envolvem o homem e os animais, já firmados desde tempos remotos e com explicações bioevolutivas, tornam-se, diante deste panorama, ainda mais fortes. A presença do animal acalma e alegra, aliviando as dores e tensões do dia (FARACO & SEMINOTTI, 2004).

Muitos profissionais da área da saúde e das relações humanas, incluindo psicólogos, assistentes sociais, médicos e veterinários, acreditam que os animais despertam emoções comunicativas nas pessoas, facilitando o processo de autoconhecimento (ROCHA, 2005). Também em relação à vida familiar, recentemente pesquisadores relataram a melhora psicológica e emocional na associação entre pessoas e seus animais de estimação. Houve relato de diminuição das tensões entre os membros da família, aumentando a compaixão inclusive no convívio social (BARKER, 1999). Também é relatado que através do animal a criança adquire mais segurança, compreensão, zelo, amor e iniciativa (SOUZA, 2005; BARKER, 1999).

A observação dos benefícios creditados à interação homem-animal levou à utilização destes em terapias no mundo todo. Tais modalidades terapêuticas recebem, em geral, a denominação de terapia assistida por animais (TAA), mas podem também ser chamadas atividades assistidas por animais (AAA) ou terapia

facilitada por cão (TFC) com crianças e idosos, equinoterapia, aquarioterapia. Todas estas terapias são comprovadas e ajudam muitas pessoas com doenças graves como câncer ou Alzheimer (OLIVA, 2004).

Estas terapias vêm sendo utilizadas desde 1962 no Canadá. O psiquiatra Boris Levinson incluiu seu cão nas sessões de terapia. A presença do cão facilitou a comunicação do profissional com as crianças acelerando o processo terapêutico, o que foi particularmente notório em relação às crianças autistas, onde a presença do animal ajudou a manter o contato com a realidade (SERPEL, 1993; BARAK et al, 2001; BARKER,1999).

Atualmente estas terapias fazem parte de instituições como abrigo de idosos, orfanatos e até presídios. Vários estudos são conduzidos para estabelecer os benefícios, os riscos e a prevenção de riscos, principalmente com relação a pessoas imunocomprometidas (BUSSOTI, et al, 2005).

“É possível que a humanidade esteja descobrindo a sensibilidade dos animais e, através dela, percebendo a possibilidade de interagir de maneira harmoniosa e unificada com toda a criação” (NETA, 2004, apud ANDERLINI & ANDERLINI, 2007).

3 - OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo, realizado com cepas fecais e urinárias provenientes de gatos domésticos, foram:

- ✓ Isolamento e identificação de cepas de *E. coli*.
- ✓ Detecção de genes condicionadores de virulência nestas cepas.
- ✓ Determinação da resistência frente a 20 agentes antimicrobianos.
- ✓ Pesquisa do fenótipo de resistência ESBL.
- ✓ Avaliação dos riscos de saúde pública envolvendo a transmissão de cepas bacterianas entre humanos e gatos.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta

Foram coletadas 43 amostras sendo 40 de origem fecal e 3 de origem urinária. As amostras fecais foram obtidas a partir de 21 gatos saudáveis e 19 diarréicos e as urinárias de 3 gatos com sintomas de infecção urinária. A coleta foi realizada após o exame clínico destes animais que vieram para consultas ou vacinas em clínicas veterinárias da região de Ribeirão Preto - SP, entre janeiro e dezembro de 2009.

Foram designados diarréicos os gatos que apresentavam trânsito de fezes com quantidades anormais de água, resultando em aumento na liquidez e na quantidade destas, de acordo com critério estabelecido por ETTINGER e FELDMAN (2004)

Neste estudo alguns animais apresentavam sintomas mais graves, como fezes com sangue e sinais clínicos de desidratação em graus variáveis, anorexia, hipertermia ou hipotermia e, em outros, constatou-se apenas diarréia sem sinais clínicos mais severos.

Os sintomas de infecção urinária considerados no presente estudo foram disúria, oligúria, polaciúria, dor à palpação abdominal, turvação da urina e/ou hematúria.

As amostras foram coletadas sob a supervisão de médicos veterinários. As de origem fecal foram obtidas utilizando-se *swab* retal com algodão estéril, a seguir colocadas em meio de transporte de Stuart, e levadas ao laboratório para o processamento imediato. As amostras de origem urinária foram coletadas por cistocentese, sonda uretral ou miccção espontânea e transferidas assepticamente para meio de cultura comercial lamino-cultivo ou placas com ágar Mac Conkey (Mac-Difco Laboratories, Detroit, USA).

4.2 Isolamento e Identificação

Para o isolamento de *E.coli* as amostras foram semeadas em meio de cultura seletiva diferencial Mac Conkey e incubadas a 37º C por 24 horas, sendo em seguida conservadas sob refrigeração (a 4°C), em geladeira. As amostras foram então semeadas por esgotamento em placas contendo meio Mac Conkey para a obtenção de colônias isoladas. De cada placa foram utilizadas cinco colônias para análises bioquímicas confirmatórias. Foram submetidas às análises as colônias que apresentavam características presuntivas de *E. coli,* levando em consideração seus aspectos (Tabela 01).

Tabela 01 – Características de colônias de Enterobactérias em meio Mac Conkey

Bactérias	**Características das colônias**
Escherichia coli	Grandes, róseas, secas e opacas
Proteus mirabilis	Incolores, onduladas e translúcidas
Enterobacter cloacae	Grandes, onduladas, amarelas, mucóides
Klesiella pneumoniae	Grandes, róseas, mucóides e translúcidas

Para os testes bioquímicos confirmatórios foram utilizados tubos contendo o meio de cultura RUGAI modificado com lisina (PESSOA & SILVA, 1972) incluindo os testes bioquímicos de indol, LTD, glicose, sacarose, produção de gás, lisina, motilidade, uréia e H_2S (KONEMAN et al, 1997). A técnica utilizada para semeadura foi a de picada até o fundo do tubo associada à técnica de estrias no ápice, com o auxílio de agulha de níquel cromo estéril. As leituras e interpretação dos resultados foram realizadas após incubação por 18 horas a 37°C e levando em conta a tabela de perfil bioquímico das enterobactérias (Figuras 02, 03 e 04), de forma que:

- ✓ Indol (produção): observada no papel da face interna da tampa após a adição de uma ou duas gotas do reativo de Kovacs. O aparecimento da cor vermelha indica reação positiva e o não aparecimento, negativa.

- ✓ LTD (Desaminação do L-triptofano): observada do ápice até a base da inclinação do meio. Sendo considerada positiva o aparecimento da cor verde garrafa (para organismos sacarose negativos) ou marrom (para os sacarose positivos).
- ✓ Sacarose (fermentação): observada entre o pico da inclinação até a base da mesma. O aparecimento da cor amarela indica reação positiva e o não aparecimento, reação negativa.
- ✓ Glicose (fermentação): observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. A reação foi considerada positiva com o aparecimento da cor amarela no meio.
- ✓ Gás (produção): observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. O aparecimento de bolhas ou o arredondamento do meio indica que a reação foi positiva e o não aparecimento, negativa.
- ✓ Uréia (hidrólise-produção de urease): Observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. O aparecimento da cor azul escura indica reação positiva e o meio inalterado, reação negativa.
- ✓ H_2S (produção): Observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. O aparecimento da cor preta indica reação positiva e o não aparecimento, reação negativa.
- ✓ Lisina (descarboxilação): Observada na fase inferior. O aparecimento da cor púrpura indica que a reação foi positiva e o aparecimento da cor amarela indica que a reação foi negativa.
- ✓ Motilidade: Observada na face inferior. Qualquer crescimento observado além da linha de picada foi considerado positivo.

Para complementar a identificação bioquímica foi realizada a prova do citrato através da semeadura por estrias na superfície de tubo inclinado contendo meio de cultura Citrato de Simons (DIFCO) (Figura 06). Após uma incubação do inóculo no meio por 24horas a 37°C foi observada a cor. Quando a cor do meio permanece inalterada, considera-se que não houve crescimento para *E.coli,* uma vez que esta bactéria não possue a permease do citrato e

consequentemente não cresce quando esta é a única fonte de carbono (EDWARDS & EWING, 1972)

As colônias obtidas das amostras de urina crescidas na face do lamino-cultivo com o meio Mac ConKey foram transferidas para placas também contendo este meio e foram submetidas às analises acima descritas.

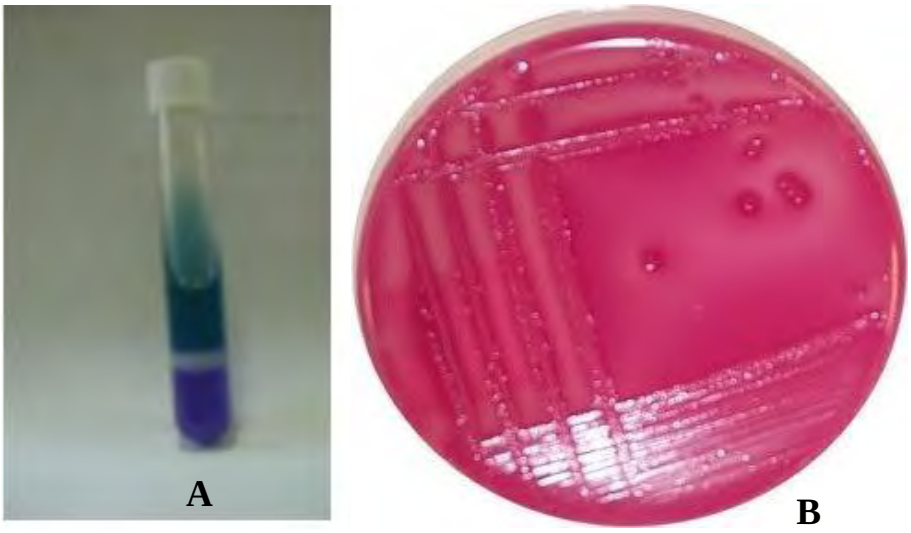
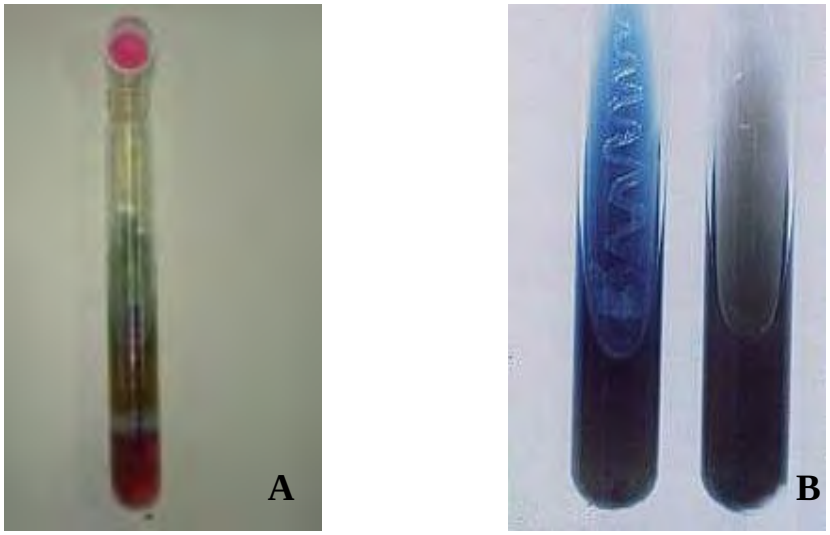


Figura 01– A: Tubo com meio de Rugai-lisina sem inóculo e **B**: colônias lactose positivas no meio Mac Conkey.



Figuras 02 – A: Amostra positiva para *E. coli* em meio Rugai com lisina e **B**: amostra citrato positiva (à esquerda), amostra citrato negativa (à direita)

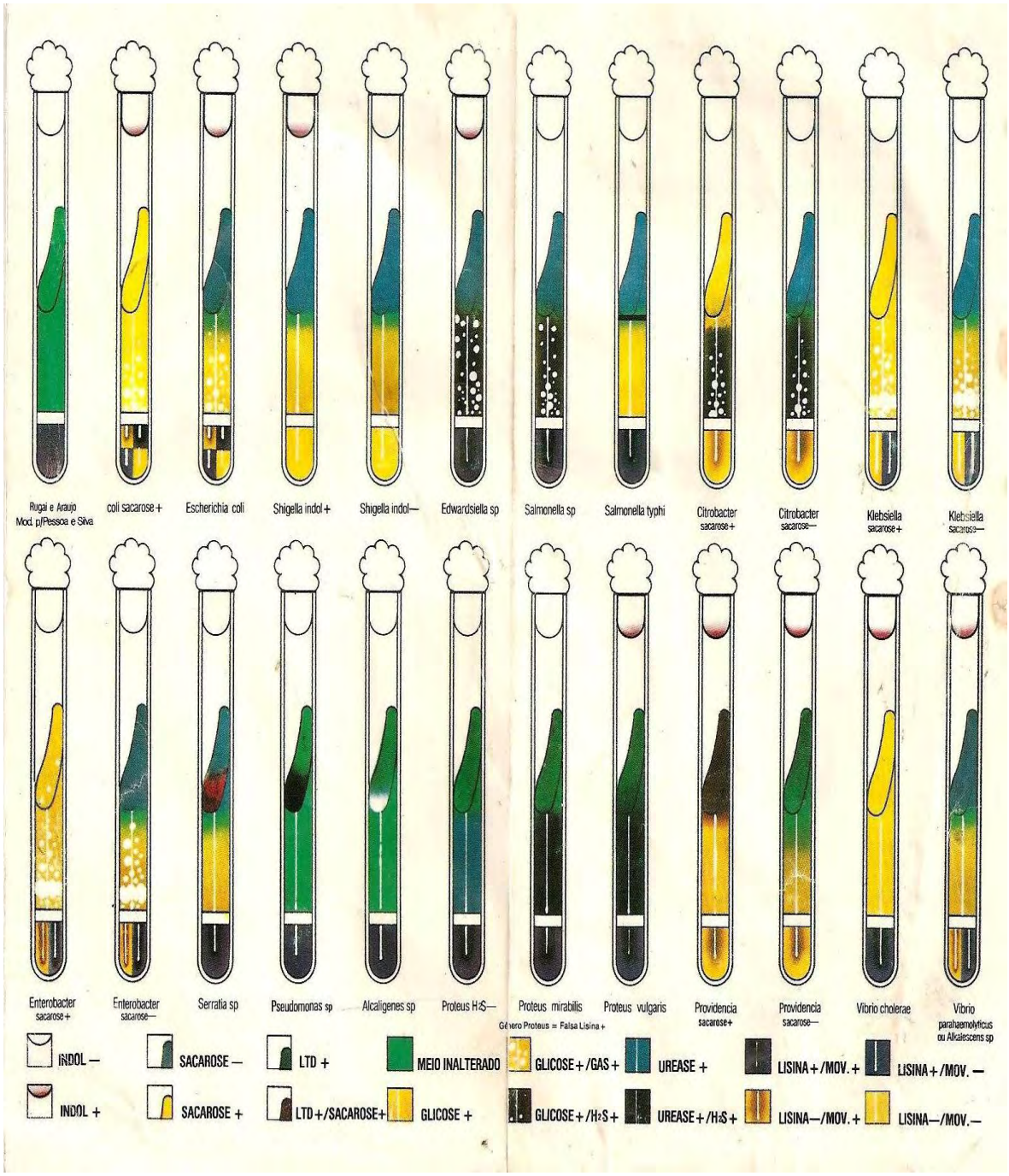


Figura 03 - Identificação bioquímica de Enterobactérias contendo provas de Indol, LTD, sacarose, glicose, produção de gás, urease, H_2S, lisina e motilidade. Fonte: Cecon- Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico.

4.3 - Testes de Susceptibilidade

O método utilizado para a determinação das suscetibilidades aos antimicrobianos foi o de difusão em disco, que proporciona uma avaliação qualitativa da sensibilidade (BAUER et al, 1966) e foi realizado segundo protocolo recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007).

Foram utilizados discos de papel de filtro impregnados com os seguintes agentes antimicrobianos (Cefar, São Paulo, Brasil): ácido nalidíxico (NAL, 30µg), ácido pipemídico (PIP, 20 µg), amicacina (AMI, 30µg), amoxacilina + ácido clavulânico (AMC), cefepima (CPM, 30 µg), cefoxitina (CFO, 30 µg), norfloxacina (NOR, 10 µg), aztreonam (ATM, 30 µg), cefuroxima (CRX, 30 µg), ceftazidima (CAZ, 30 µg), imipenem (IPM, 10µg), nitrofurantoina (NIT, 300 µg), ampicilina (AMP, 10µg), cefalotina (CFL, 30µg), ceftriaxona (CRO, 30µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg), cotrimoxazol (SUT, 25µg), gentamicina (GEN, 10µg), tetraciclina (TET, 30µg) e tobramicina (TOB, 10 µg).

De cada colônia de *E. coli* (24 horas de crescimento) foi retirada uma alíquota com um swab estéril e colocada em um tubo também estéril contendo solução salina 0,9 % e adicionada até se atingir 0,5 de densidade na escala MacFarland de turvação, correspondente a 10^{8} UFCs (Unidades formadoras de Colônias) (CLSI, 2007). Mergulhou-se um *swab* estéril nesta solução que foi então semeada em placas contendo meio agar Mueller-Hinton. Cada uma destas soluções foi inoculada em duas placas, sendo em uma delas colocados discos com os seguintes antimicrobianos: NAL, PIP, NOR, NIT, CIP, GEN, TET, TOB, AMI e SUT e, na outra placa a distribuição dos discos foi feita de modo a formar dois agrupamentos em torno de amoxacilina + ácido clavulônico (AMC). No primeiro agrupamento foram colocados os seguintes antibióticos a uma distância de 20mm entre si e entre o AMC: CPM, CRX, CFL e ATM, nesta ordem e formando um círculo ao redor do AMC, no segundo agrupamento em torno de outro disco de AMC e, observada a mesma distância entre os antibióticos em relação ao primeiro disco, foram dispostos discos contendo CAZ, CRO e CFO. AMP e IPM foram colocados na placa fora destes agrupamentos (Figuras 05 e 06).

Tal protocolo foi adotado para observar resistência do tipo ESBL e ainda sinergismo ou antagonismo entre os antibióticos dispostos em cada grupo.

As placas foram então colocadas na estufa a 37ºC por 18 a 24 horas e após este tempo a leitura foi realizada comparando-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento com parâmetros de interpretação para a leitura desses halos (CLSI, 2007). As cepas de referência *E. coli* ATCC 25922 e ATCC 35218 foram usadas como controle de qualidade.

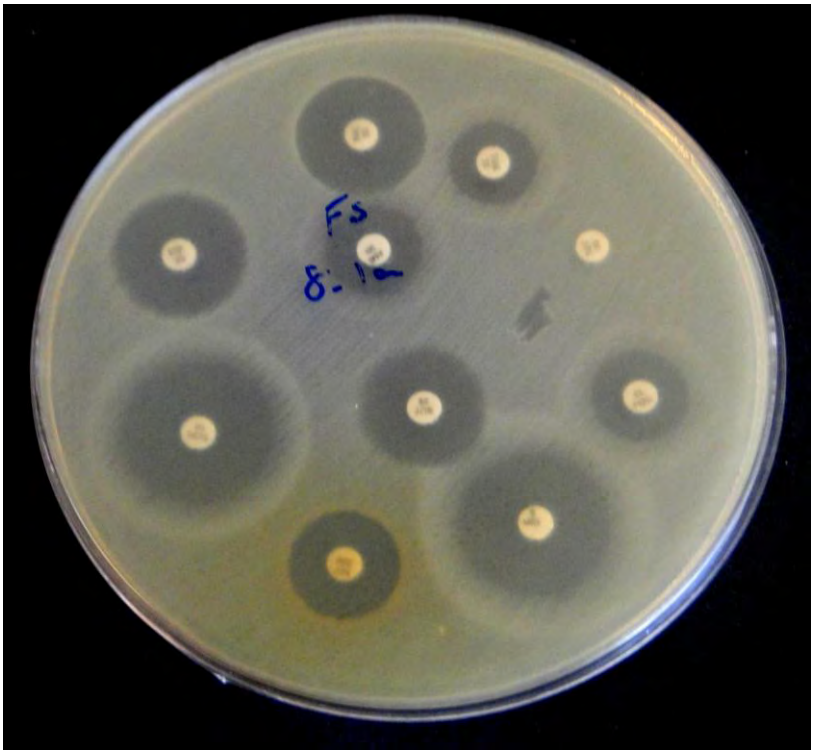


Figura 04 - Cultura de *E.coli* contendo os seguintes antimicrobianos: NAL, PIP, NOR, NIT, CIP, GEN, TET, TOB, AMI, SUT e mostrando resistência a tetraciclina (TET). Fonte: Arquivo pessoal.

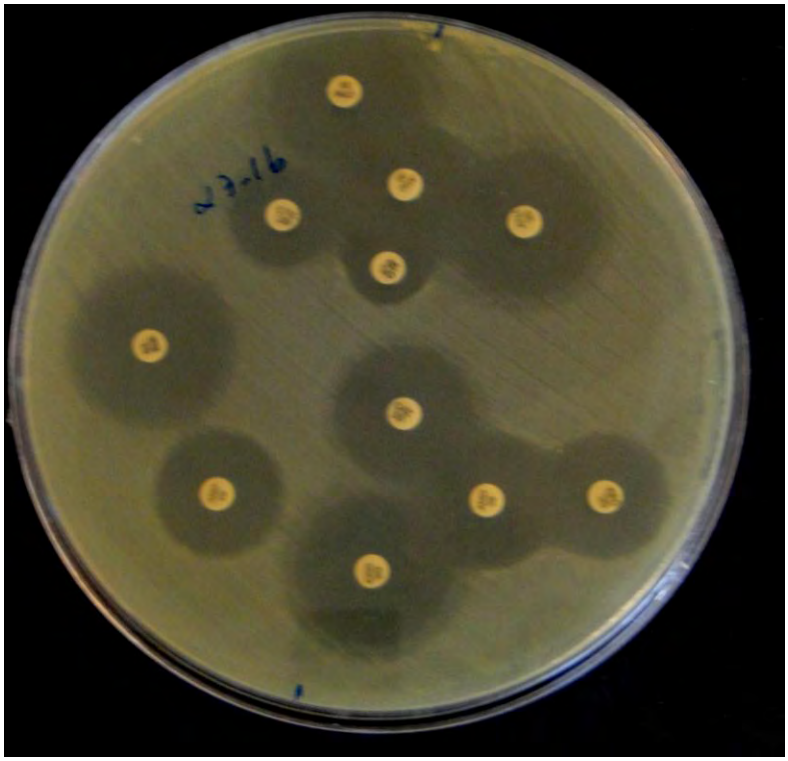


Figura 05 - Cultura de *E.coli* contendo os seguintes antimicrobianos: AMC, CPM, ATM, CRX, CFL; AMC, CAZ, CRO, CFO; IPM e AMP. Fonte: Arquivo pessoal.

4.4 - Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano foi feita segundo técnica proposta por KESKIMAKI et al (2001). Em um tubo de ensaio contendo 1 ml de meio de cultura Luria Broth (DIFCO) a *E.coli* isolada foi incubada a 37°C por 12 horas , depois transferida para um tubo eppendorf e submetida a 14.000 rpm em centrífuga Eppendorf, modelo 5415C, da Brinkmann Instruments. Inc. O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas ressuspensas em 250µl de água Millique estéril e agitadas em vortex por 30 segundos. O processo de lavagem foi repetido 1 vez e em seguida o tubo eppendorf foi colocado por 10 minutos em água fervente para lise da parede celular. Outra centrifugação a 14000 rpm foi efetuada durante 30 segundos, sendo então retirados 150 µl do sobrenadante. Este foi

transferido para outro eppendorf e estocado como molde de DNA (DNA Template), sendo então conservado a -20°C até o momento do uso.

4.5 - Amplificação do DNA

A determinação dos genes de virulência *stx* 1, *stx* 2 e *eae* foram realizadas conforme CHINA et al (1996). Os primers utilizados foram adquiridos da IDT (Integrated DNA Technologies, Inc). A amplificação do DNA bacteriano foi realizada em 50 µl contendo 10µl de amostra do sobrenadante, 0,5 µl de cada primer, 0,2 mM (cada) dATP, dGTP, dCTP,dTTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM Mg Cl_2, 50 mM KCl e 2,5 U de Taq polimerase (Biotol). Esta mistura foi submetida a um termociclador (Eppendorf Mastercycler) a 94 ◦C por 5 minutos (desnaturação) seguido de 30 ciclos de 94 ◦C por 1 minuto (desnaturação), 55 ◦C por 1 minuto (anelamento) e 72 ºC por 1 minuto (extensão). No último ciclo a última fase foi realizada por um tempo maior (10 minutos) para completa extensão pela Taq polimerase (Tabela 02).

Tabela 02 – Quantidades de cada reagente utilizados na reação para detecção dos genes *stx_1, stx_2, eae.*

Reação	**1x**	**10x**	**15x**	**20x**	**25x**
DNA template	4 µl				
TAQ	1,5 µl	15 µl	27,5 µl	30 µl	37,5 µl
Tampão	5 µl	50 µl	75 µl	100 µl	125 µl
DNTP (2µM)	5 µl	50 µl	75 µl	100 µl	125 µl
Primer (0,5 µl cada)	3 µl (0,5 cada)	30 µl (5 cada)	45 µl (7,5 cada)	60 µl (10 cada)	75 µl (12,5 cada)
H_2O	31,5 µl	315 µl	472,5 µl	630 µl	787,5 µl
Total	50 µl	46 µl/T	46 µl/T	46 µl/T	46 µl/T

A seqüência de bases (primers) e o tamanho dos segmentos específicos dos genes *stx_1*, *stx_2* e *eae* amplificados podem ser observados na tabela 03.

Tabela 03 - Primers utilizados na PCR para amplificação dos fragmentos específicos dos genes *stx*$_1$, *stx*$_2$, *eae*

Primers	**Seqüência de nucleotídeos**	**Tamanho do produto de amplificação (pb)**
eae B52	AGGCTTCGTCACAGTTG	570
eae B53	CCATCGTCACCAGAGGA	
stx$_1$ B54	AGAGCGATGTTACGGTTTG	388
stx$_1$ B55	TTGCCCCCAGAGTGGATG	
stx $_2$ B56	TGGGTTTTTCTTCGGTATC	807
stx $_2$ B57	GACATTCTGGTTGACTCTCTT	

Foram utilizados três jogos de primers sintetizados pela Invitrogen, cada um dos jogos de primers foi utilizado para amplificação de um dos três operons fimbriais estudados, *pap*, *afa*, *sfa*. O PCR foi realizado em um volume de 25 µl contendo 5 µl do DNA template, 1,0 µM 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 ºC por 5 minutos seguido por 25 ciclos de desnaturação a 94 ºC por 2 minutos, anelamento a 65 ºC por 1 minuto, extensão a 72 ºC por 2 minutos e um ciclo final de extensão a 72 ºC por 10 minutos. Segundo o protocolo estabelecido por LE BOUGUENEC et al (1992) (Tabela 04).

Tabela 04 - Quantidades de cada reagente utilizados na reação para detecção dos genes *pap, afa, sfa.*

Reação	**1x**	**10x**	**15x**	**20x**	**25x**
DNA template	5				
H_2O	1,5 µl	125 µl	187,5 µl	250 µl	312,5 µl
Tampão	2,5 µl	25 µl	37,5 µl	50 µl	62,5 µl
En2 TAQ	1 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl
DNTP (2 mm)	1 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl
Primer	3 µl	30 µl	45 µl	60 µl	75 µl
(1 ml cada)	(1 cada)	(10 cada)	(15 cada)	(21cada)	(25 cada)
Total	25 µl	20 µl/T	20 µl/T	20 µl/T	20 µl/T

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.

A tabela 05 apresenta a seqüência de bases (primers) e o tamanho dos segmentos dos genes *pap, sfa, afa.*

Tabela 05 - Primers utilizados na PCR para amplificação dos fragmentos específicos dos genes *pap, sfa, afa*

Primer	**Seqüência de nucleotídeos**	**Tamanho do produto de amplificação (pb)**
pap 1	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	
pap 2	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	328
sfa 1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	
sfa 2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410
afa 1	GCTGGGCAGCAAACTGATAACTCTC	
afa 2	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	750

4.6 Manutenção das Amostras de *E.coli*

Após o isolamento, cada uma das amostras obtidas foi mantida de duas maneiras:

- Através de repique semanal em placas de Petri ou quinzenal em tubo de ágar inclinado, sempre em meio de LB (Luria Bertani) e conservadas a 4ºC em geladeira.

- Em freezer a -20ºC em tubos de plástico de microcentrífuga contendo 50% de um crescimento bacteriano em LB (Luria Bertani) líquido e 50% de uma solução de glicerol a 70%.

5 - RESULTADOS

Foram isoladas 205 cepas de *E. coli* de 43 amostras obtidas de 21 gatos saudáveis (n=95 cepas), 19 diarréicos (n=95 cepas) e 3 com sintomas de infecção do trato urinário (n=15 cepas) .

Do total de amostras urinárias coletadas de animais apresentados às clínicas com sintomas de ITU, apenas 9 apresentaram crescimento bacteriano na superfície do laminocultivo contendo meio seletivo Mac Conkey, sugerindo a presença de micro-organismo Gram negativo. Destas, três foram positivas para *E. coli*, permitindo o isolamento de 15 cepas.

As 43 amostras foram provenientes de 26 gatos machos (60,5%) e 17 fêmeas (39,5%). Os animais do presente estudo foram ainda distribuídos por faixa etária e sexo em cada categoria segundo as Figuras 07 a 09.

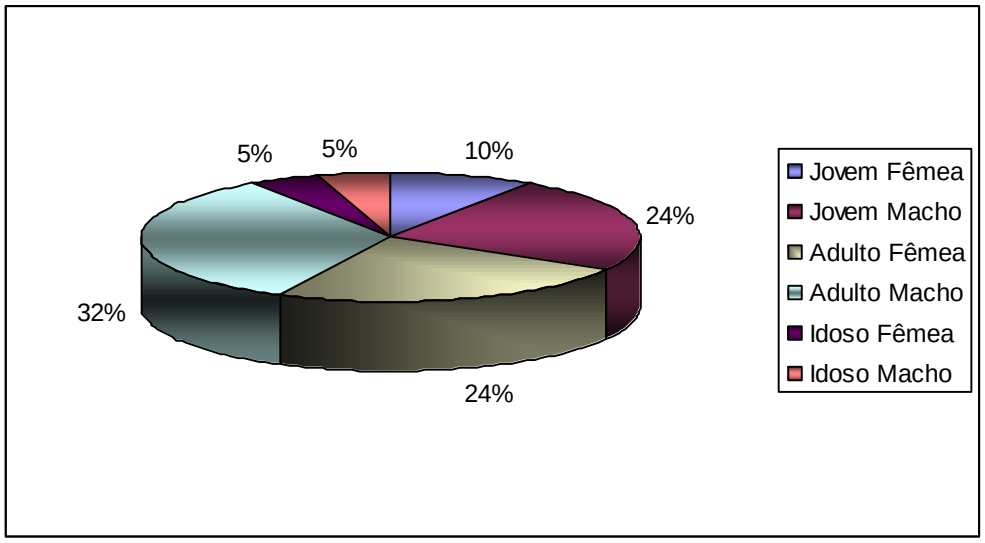


Figura 06 - Distribuição dos gatos saudáveis, estudados entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto - SP, segundo faixa etária e sexo.

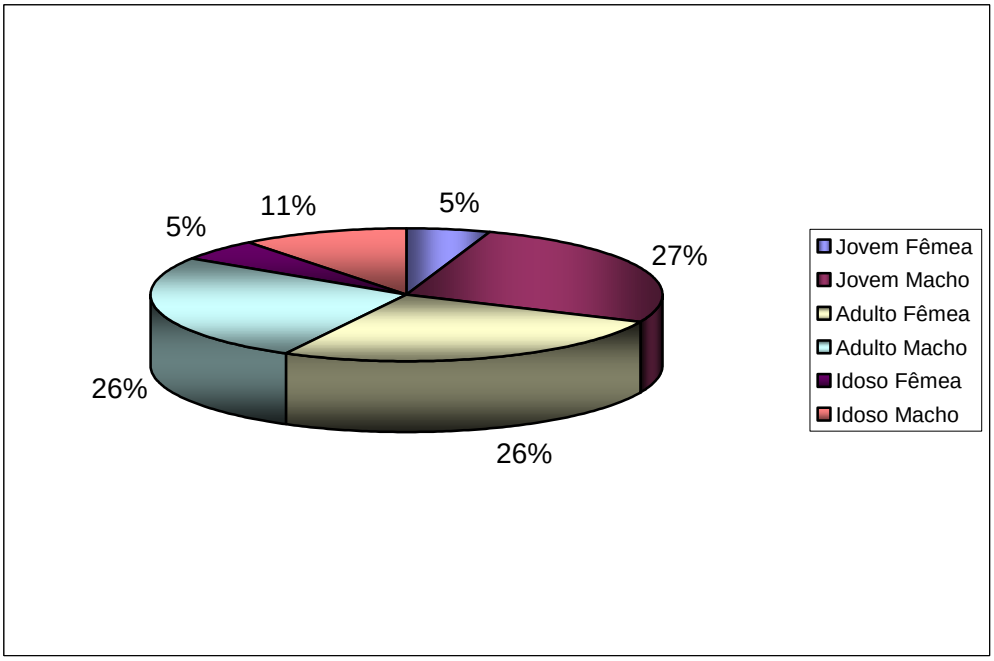


Figura 07 – Distribuição dos gatos diarréicos, estudados entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto – SP, segundo faixa etária e sexo.

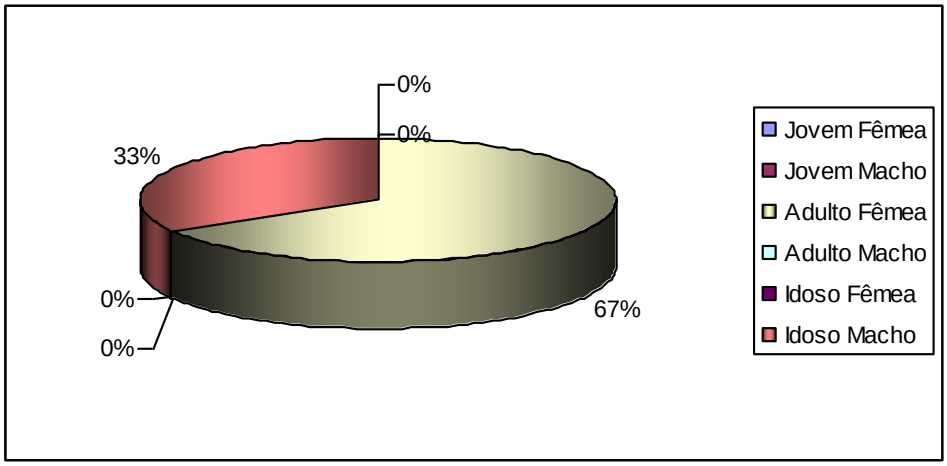


Figura 08 – Distribuição dos gatos com ITU, estudados entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto – SP, por faixa etária e sexo.

As 205 cepas, identificadas em meio de Rugai com lisina, apresentaram grande similaridade em relação ao padrão bioquímico estabelecido para *E. coli*

quanto à fermentação da glicose (todas foram positivas), à produção de gás (a maioria produziu, porém em pequenas quantidades), e motilidade. Para a *E.coli* o crescimento no meio seletivo Mac Conkey com formação de colônias grandes, róseas, secas e opacas as caracteriza como lactose positivas sendo sugestivo de se tratar do micro-organismo em questão. Provas bioquímicas confirmatórias como indol, motilidade, fermentação da glicose e sacarose, produção de gás e descarboxilação da lisina devem ser positivas para *E. coli* com percentuais predeterminados de variação que podem ser vistos nas tabelas que incluímos no apêndice deste trabalho. Urease, produção de H_2S, desaminação do triptofano e utilização do citrato, são provas em que mais de 90% das cepas de *E.coli* são negativas.

Entretanto algumas cepas mostraram uma inesperada variabilidade em relação à fermentação da sacarose e à descarboxilação da lisina, diferindo do padrão bioquímico estabelecido para *E. coli* nestes aspectos. Entre os gatos diarréicos a maioria das cepas (71,6%) não fermentou a sacarose e entre estas algumas também não descarboxilaram a lisina, não apresentaram motilidade e fermentaram a glicose, porém sem a produção de gás. Este comportamento bioquímico ocorreu em 4,21% das cepas dos gatos diarréicos, 6,31% das dos saudáveis e 20% das cepas dos gatos com ITU, sendo sugestivo de um tipo raro de *E. coli*, denominado Alkalescens-Dispar ou *E. coli* inativa. Este grupo antigamente era considerado como pertencente ao gênero *Shiguella*, tal sua semelhança bioquímica. Para a confirmação desta hipótese está sendo providenciada a sorologia destas cepas a qual será realizada no Instituto Adolfo Lutz. Sendo de um dos sorogrupos considerados de cepas invasoras como, por exemplo, 028ac, 029, 0136, 0144, 0152, 0112ac, 0124, 0143, 0164, 0167, então haverá a confirmação como *E*. *coli* inativa ou Alkalescens-Dispar.

Há poucos relatos deste grupo de *E. coli* na literatura e alguns autores a relacionaram a casos de diarréia infantil e de infecções do trato urinário (LEVINE & TANIMOTO, 1953; CANDEIAS et al,1968; KAUFFMAN, 1969; CRICHTON et al, 1981; FAUNDEZ et al, 1988; BETIOLL et al, 1994). SORESCU et al (2000)

isolaram cepas de *E. coli* Alkalescens-Dispar em fezes de suínos com diarréia. Entretanto, não foi encontrada na literatura referências à *E. coli* inativa isolada em amostras de gatos.

A tabela 06 apresenta o perfil bioquímico de algumas bactérias de importância clínica incluindo *E. coli* inativa. A Tabela 07 compara o perfil bioquímico das cepas analisadas neste trabalho com as cepas de *E. coli* e *E. coli* inativa segundo dados do Manual Microbiológico da ANVISA e a tabela 08 ressalta os testes bioquímicos onde as cepas do presente trabalho apresentam semelhança bioquímica com *E. coli* Alkalescens-Dispar. As Tabelas apresentadas no Apêndice deste trabalho apresentam o perfil bioquímico mais utilizado nas rotinas laboratoriais das Enterobactérias de maior importância clínica, segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Tabela 06 – Perfil bioquímico de algumas enterobactérias de importância clínica incluindo *E.coli e E.coli* inativa segundo Manual de Microbiologia da ANVISA (2004)

Bactérias	***Citrato***	***Urease***	***Lisina***	***sacarose***	***Lactose***	***Gás***	***motilidade***	***PB#***
Y. enterocolitica	neg	75%+	neg	95%+	5%+	5%+	neg	50%
Shigella spp.	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	50%
Klebsiella oxytoca	+	+	+	100%+	+	++	neg	99%
E. coli inativa (rara)	neg	neg	40%+	15%+	25%+	neg	neg	80%
E. coli	neg	neg	90%+	50%+	95%+	95%+	95%+	97%

PB# =Padrão bioquímico; (%+)= percentual de cepas positivas; neg= reação negativa

Tabela 07 – Perfil bioquímico das cepas de *E. coli* isoladas entre gatos saudáveis, diarréicos e com ITU, entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto e de *E. coli* e *E. coli* inativa segundo Manual Microbiológico da ANVISA (2004).

Bactérias	*Citrato*	*Urease*	*Lisina*	*sacarose*	*Lactose*	*Gás*	*motilidade*	*PB#*
E. coli S	neg	neg	64,2%+	56,8%+	85%+	68,4%+	98,9%+	---
E. coli D	neg	neg	94,7%	28,4%+	90%+	49,6%+	95,8%+	---
E.coli ITU	neg	neg	80%+	0+	100%+	34%+	100%+	---
E. coli inativa (rara)	neg	neg	40%+	15%+	25%+	neg	neg	80%
E. coli	neg	neg	90%+	50%+	95%+	95%+	95%+	97%

PB# = Padrão bioquímico; neg= reação negativa; S = Gatos saudáveis; D = gatos diarréicos; ITU = gato com infecção do trato urinário.

Tabela 08 – Percentuais de cepas apresentando características bioquímicas semelhantes às de *E. coli* inativa entre gatos saudáveis, diarréicos ou com ITU, entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto.

	Gatos Saudáveis	***Gatos Diarréicos***	***Gatos ITU***
Sacarose /gás /Lisina neg.	6,3	4,2	20
Gás neg.	31,6	50,5	66
Lisina neg.	35,8	5,3	20
Motilidade neg.	1,0	4,2	1
Sacarose neg.	43,2	76,8	100

Neg= negativo

Foram pesquisados os genes codificadores de fatores de virulência *eae, pap, sfa, stx_1 e stx_2*, relacionados com a produção de lesões do tipo “attaching-effacing”(*eae*), fímbrias (*pap e sfa*) e “shigalike” toxina ou verotoxina (*stx_1 e stx_2*). Os genes *stx_1* ou *stx_2* e *afa* não foram encontrados entre as cepas estudadas (Figuras 09 a 11).

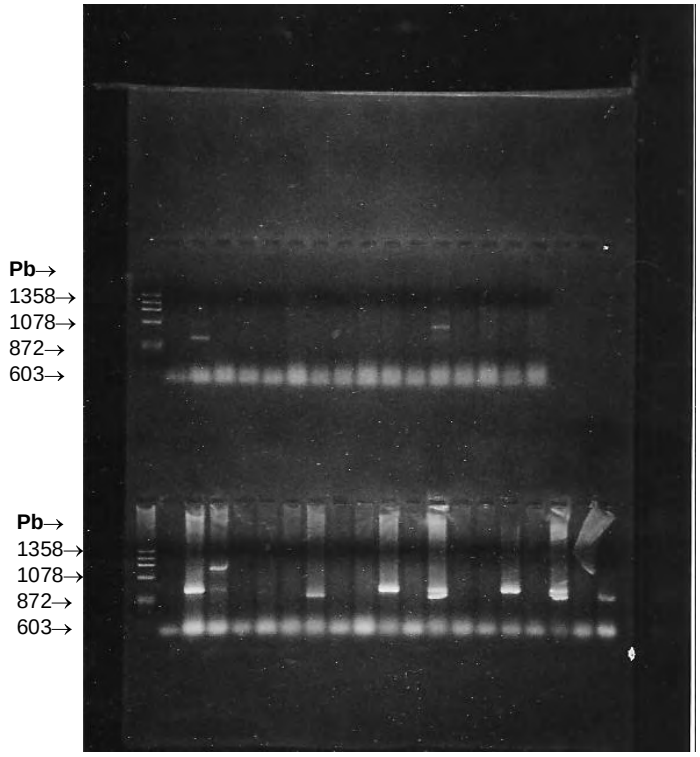


Figura 09 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado à esquerda.

Foto A - Canaleta 1: marcador de peso molecular _X174 RFDNA – digestão com Hae lll; Canaleta 2 controle negativo; Canaleta 3: controle positivo *stx1*; Canaleta 4: F25-1 N; Canaleta 5: F 26-1 N; Caneleta 6: F 27-1 N; Canaleta 7: F14-2 N; Canaleta 8: F 14-4 N; Canaleta 9: F 23-2 N; Canaleta 10: F 25-3 N; Canaleta 11: F 21-3 N; Canaleta 12: F 16-2 N; Canaleta 13: F 14-3 *eae* +; Canaleta 13: F 14-2 N; Canaleta 14: F 9-3 N; Canaleta 15: F 12-4 N; Canaleta 16: Fs 1-1 N

Foto B - Canaleta 1: marcador de peso molecular _X174 RFDNA – digestão com Hae lll; Canaleta 2 controle negativo; Canaleta 3: controle positivo *pap*; Canaleta 4: controle positivo Edilene 28 *pap* e *afa*; Canaleta 5: F 14-4 N; Caneleta 6: F 23-2 N; Canaleta 7: F 21-3 N; Canaleta 8: F28-3 *pap*+; Canaleta 9: F 14-3 N; Canaleta 10: F 12-4 N; Canaleta 11: F9-3 *sfa* +; Canaleta 12: Fs 6-1 N; Canaleta 13: Fs 1-1 *pap*/*sfa*+; Canaleta 14: Fs 8-3 N; 15: Fs 4-1 N; Canaleta 16: Fs 7-2 *sfa*+; Canaleta; Canaleta 17: Fs 3-3 N; Canaleta 18: Fs 2-5 *pap*; Canaleta 19: Fs: 3-4 N; Canaleta 20: controle Edilene 57 *pap*

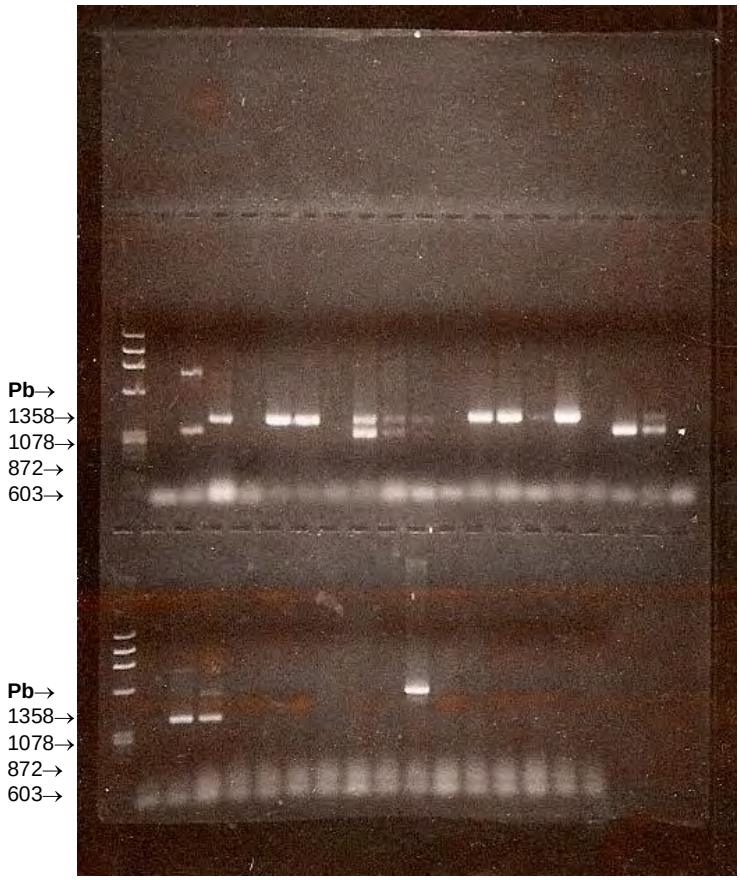


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado à esquerda.

Foto A - Canaleta 1: marcador de peso molecular _X174 RFDNA – digestão com Hae lll; Canaleta 2 controle negativo; Canaleta 3: controle positivo EDI 28 *pap/afa*+; Canaleta 4: controle positivo EDI 30 *sfa*+; Canaleta 5: F 8-1 N; Caneleta 6: F 9-1 *sfa*+; Canaleta 7: F10-1 *sfa*+; Canaleta 8: F 11-1 N; Canaleta 9: F 12-1 *pap*+/*sfa* +; Canaleta 10: F13-1 pap +/*sfa* +; Canaleta 11: F 14-1 *sfa*; Canaleta 12: F 16-1 N; Canaleta 13: F 17-1 *sfa*; Canaleta 14: F 21-*1sfa*; Canaleta 15: F 22-1 *sfa*+; Canaleta 16: F 23-1 *sfa;* Canaleta 17:F24-1 N; Canaleta 18: F25-1 *pap+;* Canaleta 19: F26-1 *pap*; Canaleta 20: F27-1 N

Foto B - Canaleta 1: marcador de peso molecular _X174 RFDNA – digestão com Hae lll; Canaleta 2 controle negativo; Canaleta 3: controle positivo stx_1; Canaleta 4: controle positivo stx_1; Canaleta 5: F 8-1 N; Caneleta 6: F 9-1 N; Canleta 7: F10-1 N; Canaleta 8: F 11-1 N; Canaleta 9: F 12-1 N; Canaleta 10: F 3-1 N; Canaleta 11: F 14-1 *eae*; Canaleta 12: F 16-1 N; Canaleta 13: F17-1 N; Canaleta 14: F 21-1 N; Canaleta 15:F 22-1 N; Canaleta 16: F 23-1 N; Canaleta 17: F 24-1 N

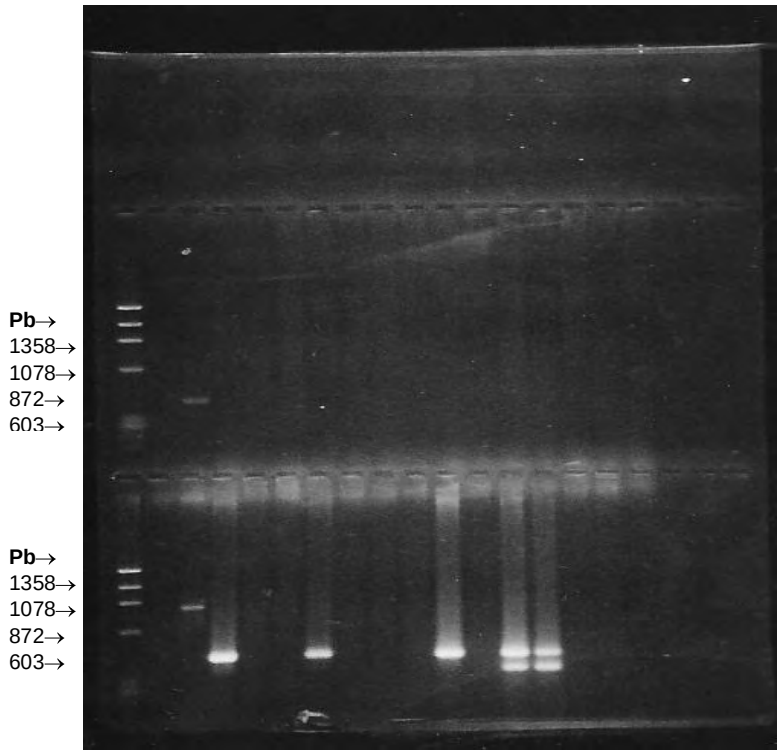


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado à esquerda.

Foto A - Canaleta 1: marcador de peso molecular _X174 RFDNA – digestão com Hae lll; Canaleta 2 controle negativo; Canaleta 3: controle positivo *stx*$_1$; Canaleta 4: controle negativo*:* Canaleta 5: Fs 2-5 N; Canaleta 6: Fs 3-3 N; Canaleta 7: Fs 4-1 N; Canaleta 8: Fs 6-1 N; Canaleta 9: Fs 7-2 N*;* Canaleta 10: Fs 8-3; Canaleta 11: Fs 9-1N*;* Canaleta 12: Fs 13-2 N; Canaleta 13: Fs 17-3N; Canaleta 14: Fs 18-5 N; Canaleta 15: Fs 18-3 N; Canaleta 16: Fs 9-4 N

Foto B - Canaleta 1: marcador de peso molecular _X174 RFDNA – digestão com Hae lll; Canaleta 2 controle negativo; Canaleta 3: controle positivo *pap/afa*; Canaleta 4: controle positivo *sfa:* Canaleta 5: Fs 4-1 N; Canaleta 6: Fs 6-1 N; Canaleta 7: Fs 7-2 *sfa*+; Canaleta 8: Fs 8-3 N; Canaleta 9: Fs 9-1 N*;* Canaleta 10: Fs 13-2 N; Canaleta 11: Fs 17-3 *sfa;* Canaleta 12: Fs 18-5 N; Canaleta 13: Fs 10-1 *pap*/*sfa*+; Canaleta 14: Fs 14 *pap*/*sfa*+ ; Canaleta 15: Fs 19-2 N; Canaleta 16: Fs 20-3 N

Pelo menos um dos genes de virulência pesquisado foi encontrado em 24,2% das cepas dos gatos saudáveis (n=23 cepas) e em 59% das dos diarréicos (n= 55 cepas). O gene *eae* foi observado apenas no grupo dos gatos diarréicos e sempre associado ao gene *sfa*, estando presente em 5 cepas (5,26%). O gene *pap* foi encontrado em 11 cepas dos gatos saudáveis (11,6%) e sempre associado ao gene *sfa*. Entre os diarréicos o gene *pap* foi observado em 25 cepas (26,3%) tendo ocorrido tanto isoladamente (16%) como associado ao gene *sfa* (10,5%) e, entre os com ITU ocorreu em 10 cepas também associado ao *sfa*. O gene *sfa* foi encontrado em maior abundância, estando presente nos três grupos e ocorrendo tanto isolado como associado. Nos saudáveis estava presente em 23 cepas (24,2%), tendo ocorrido isoladamente em 12 destas (12,6%). Entre os diarréicos ocorreu em 40 cepas (42,1%), sendo encontrado isoladamente em 25 cepas (26,3%). Entre os com ITU foi observado em todas as 15 cepas, estando associado ao *pap* em 10 delas e nas outras 5 ocorreu isoladamente.

A tabela 09 mostra a freqüência destes genes entre as categorias de animais do estudo.

Tabela 09 – Presença dos genes *eae, pap* e *sfa* entre os gatos saudáveis, diarréicos e com ITU estudados entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto.

Genes	***Gatos Saudáveis***	***Gatos Diarréicos***	***Gatos com ITU***
pap	0	15	0
eae	0	0	0
sfa	12	25	5
pap+eae	0	0	0
pap+sfa	11	10	10
sfa+eae	0	5	0
Total	23	55	15

A escolha dos 20 agentes antimicrobianos para verificar as suscetibilidades entre os isolados clínicos (19 gatos diarréicos e 3 com sintomas de ITU) e os controles (21 gatos saudáveis) foi baseada em protocolos sugeridos pela CLSI (2007) para Enterobactérias Gram – em isolados clínicos de ITU e diarréia. Tal protocolo permite ainda a verificação de resistência do tipo ESBL (Betalactamases de espectro estendido) e a observação de sinergismo ou antagonismo em associações de antibióticos. Além disso, os antibióticos testados são de uso freqüente na clínica veterinária de pequenos animais.

Os gatos saudáveis apresentaram 59 cepas susceptíveis aos 20 antimicrobianos testados (62,1%), 33 cepas resistentes a pelo menos 1 antibiótico (34,7%) e 3 cepas com sensibilidade intermediária (3,15%), tendo sido encontradas maiores resistências para tetraciclina (30,5%), cotrimoxazol (17,9%), e ampicilina (20,0%).

Os gatos diarréicos apresentaram 28 cepas suscetíveis a todos os antimicrobianos testados (29,5%), 52 resistentes a pelo menos um antimicrobiano (54,7%), e 15 cepas exibindo apenas sensibilidade intermediária (16%). Além disso, das 52 cepas relatadas como resistentes a pelo menos um antibiótico, 29 apresentaram ainda sensibilidade intermediária a pelo menos outro antibiótico, o que conduz ao total de 44 cepas apresentando sensibilidade intermediária (46,3%). A maior resistência observada foi para cefalotina (42,1%), seguida pela tetraciclina (20%) e ampicilina (15,7%).

Entre as 15 cepas de origem urinária 6 apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos testados (40%), 9 foram resistentes a pelo menos um antibiótico (60%). Duas cepas (20%) entre as 9 resistentes apresentaram também sensibilidade intermediária a outro antibiótico. A maior resistência foi para ampicilina com 7 cepas (46,6%), seguida por tetraciclina e ácido nalidíxico, com 5 cepas (33,3%) e cefalotina, 2 cepas (13,3%). Estes resultados estão resumidos na tabela 10.

Tabela 10 – Número de cepas (e percentuais) de resistência, sensibilidade intermediária e sensibilidade entre os grupos de animais estudados (em relação ao total de cepas de cada grupo), entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto.

	R	***R+ SI***	***SI***	***S***	*Total*
Saudáveis	33 (34,7%)	0	3 (3,15%)	59 (62,1%)	95
Diarréicos	52 (54,8%)	44(46,3%)	15(16%)	28 (29,5%)	95
ITU	9 (60%)	3 (20%)	0	6 (60%)	15

R= Número de cepas resistentes; R+SI= Nº. de cepas resistentes a pelo menos um antibiótico apresentando também sensibilidade intermediária a pelo menos outro antibiótico; SI= Nº. de cepas apresentando apenas sensibilidade intermediária e S= Nº. de cepas sensíveis a todos os antimicrobianos testados.

Na tabela 11 descreve-se o perfil de suscetibilidades frente aos 20 antimicrobianos testados e na figura 13 estão representadas a resistência, a sensibilidade e a sensibilidade intermediária entre os gatos saudáveis, diarréicos e com sintomas de ITU.

Tabela 11 – Perfil de suscetibilidades a 20 agentes antimicrobianos em cepas de origem fecal de *E. coli* isoladas de gatos saudáveis e diarréicos e de cepas urinárias isoladas de gatos com sintomas de ITU, entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto.

Agentes antimicrobianos	***Gatos Saudáveis***			***Gatos diarréicos***			***Gatos com ITU***		
	R	***S***	***SI***	***R***	***S***	***SI***	***R***	***S***	***SI***
Amicacina	**0**	**97,9**	**2,1**	**1**	**93,7**	**5,3**	**0**	**100**	**0**
Ampicilina	**20**	**80,0**	**0**	**15,8**	**73,7**	**10,5**	**46,7**	**46,6**	**6,7**
Amoxicilina+ácid.clav.	**0**	**100**	**0**	**0**	**95,8**	**4,2**	**0**	**100**	**0**
Aztreonam	**0**	**100**	**0**	**0**	**95,8**	**4,2**	**0**	**100**	**0**
Cefepime	**0**	**100**	**0**	**0**	**100**	**0**	**0**	**100**	**0**
Cefoxetina	**0**	**100**	**0**	**0**	**100**	**0**	**0**	**100**	**0**
Ceftazidima	**0**	**100**	**0**	**0**	**100**	**0**	**0**	**100**	**0**
Ceftriaxona	**0**	**100**	**0**	**0**	**100**	**0**	**0**	**100**	**0**
Cefuroxima	**0**	**100**	**0**	**1**	**84,3**	**14,7**	**0**	**100**	**0**
Cefalotina	**0**	**99**	**1**	**42,1**	**35,8**	**22,1**	**15**	**71,7**	**13,3**
Ciprofloxacina	**0**	**100**	**0**	**1**	**96,9**	**2,1**	**0**	**100**	**0**
Cotrimoxazol	**17,9**	**82,1**	**0**	**3,1**	**96,9**	**0**	**0**	**100**	**0**
Gentamicina	**2,1**	**97,9**	**0**	**0**	**94,7**	**5.3**	**0**	**100**	**0**
Imipenem	**0**	**100**	**0**	**0**	**100**	**0**	**0**	**100**	**0**
Ácid. Nalidíxico	**2,1**	**97,9**	**0**	**5,6**	**93,4**	**1**	**33,3**	**66,7**	**0**
Nitrofurantoína	**0**	**100**	**0**	**2,1**	**86,3**	**11,6**	**0**	**100**	**0**
Norfloxacina	**2,1**	**97,9**	**0**	**0**	**100**	**0**	**0**	**100**	**0**
Ácido pipemídico	**3,2**	**96,8**	**0**	**0**	**100**	**0**	**0**	**100**	**0**
Tetraciclina	**30,5**	**69,5**	**0**	**20**	**79,0**	**1**	**33,3**	**100**	**0**
Tobramicina	**0**	**100**	**0**	**0**	**87,4**	**12,6**	**0**	**100**	**0**

R = %Resistência; S = %Sensibilidade; SI = %Sensibilidade intermediária.

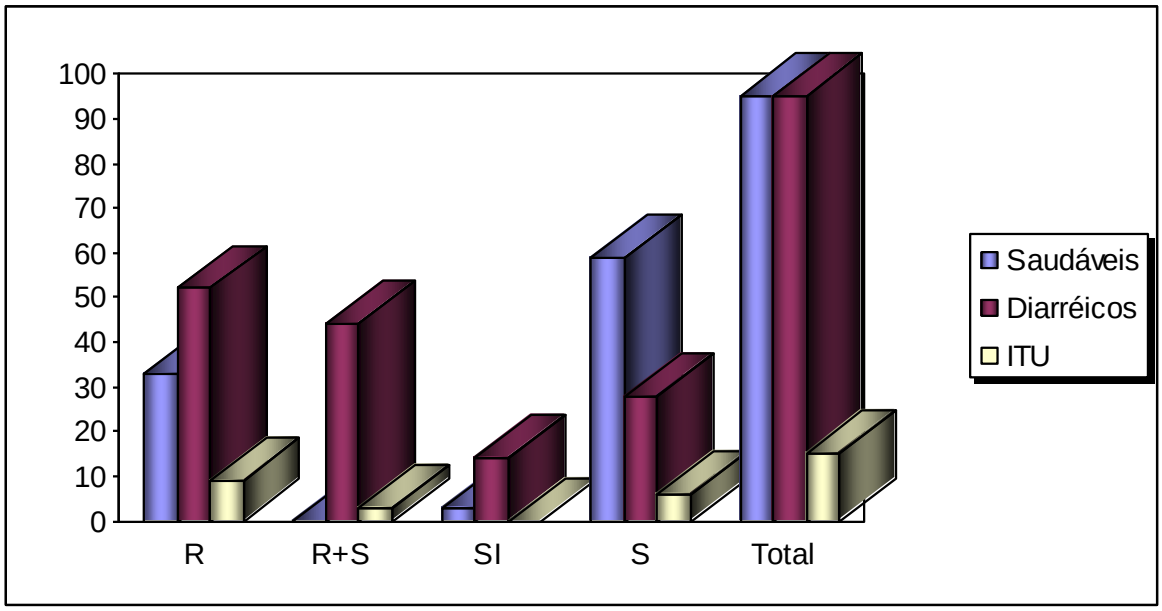


Figura 12 – Representação da resistência, sensibilidade intermediária e sensibilidade entre as cepas isoladas de gatos saudáveis, diarréicos e com ITU, entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto.
R= Nº. cepas apresentando resistência a pelo menos um antibiótico; R+S= Nº. cepas apresentando resistência a pelo menos um antibiótico mais sensibilidade intermediária a pelo menos outro antibiótico; SI= Nº. sensibilidade intermediária a pelo menos um antibiótico e S= sensibilidade aos 20 antimicrobianos testados. Total= Nº.total de cepas de cada grupo.

Multiresistência a drogas (MDR), caracterizada como a resistência a três ou mais agentes antimicrobianos, foi encontrada nos 3 grupos. Os fenótipos de resistência exibidos pelas 205 cepas são apresentados na tabela 12 e foram calculados com base no total de cepas de cada categoria. O fenótipo mais freqüente de MDR foi o da resistência a ácido nalidíxico-ampicilina-tetraciclina que foi encontrado entre 33,3% das cepas dos animais com sintomas de ITU, e em 5,26% dos gatos diarréicos. Para os saudáveis foi ampicilina-cotrimoxazol-tetraciclina, encontrada em 15,8% das bactérias.

Tabela 12 – Fenótipo de resistência entre cepas de *E. coli* isoladas de gatos saudáveis (n=95 cepas), gatos diarréicos (n=95 cepas) e gatos com sintomas de ITU (n=15 cepas), entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto.

Fenótipo de resistência *	*Gatos Saudáveis*	*Gatos Diarréicos*	*Gatos com ITU*
AMP	1,1	------	13,3
CRX	1,1	1,1	----
CFL	------	29,5	13,3
TET	11,6	1,1	----
AMP/CFL	------	2,1	----
AMP/NAL	------	------	-----
AMP/TET	1,1	5,3	-----
CFL/CIP	-----	1,1	-------
CFL/TET	-----	5,3	------
PIP/SUT	1,1	------	------
TET/SUT	1,1		-----
AMP/NAL/TET	----	5,3	33,3
AMP/SUT/TET	15,8	-----	------
AMP/CFL/SUT/TET	------	1.1	------
AMI/AMP/CFL/NIT/SUT/TET	-----	2,1	------
AMP/CIP/GEN/NAL/NOR/PIP/TET	2,1	------	------

* Percentual calculado considerando-se o total de cepas para cada grupo de gatos. AMI (Amicacina); AMP (Ampicilina); CRX (Cefuroxima); CFL (Cefalotina); CIP (Ciprofloxacina); GEN (Gentamicina); NAL (Ácid.Nalidíxico); NIT (Nitrofurantoína); NOR (Norfloxacina); PIP (Ácid. Pipemídico); TET (Tetraciclina).

Os perfis de resistência e sensibilidade intermediária podem ser visualizados dentro de cada grupo de animais segundo as figuras 14, 15 e 16.

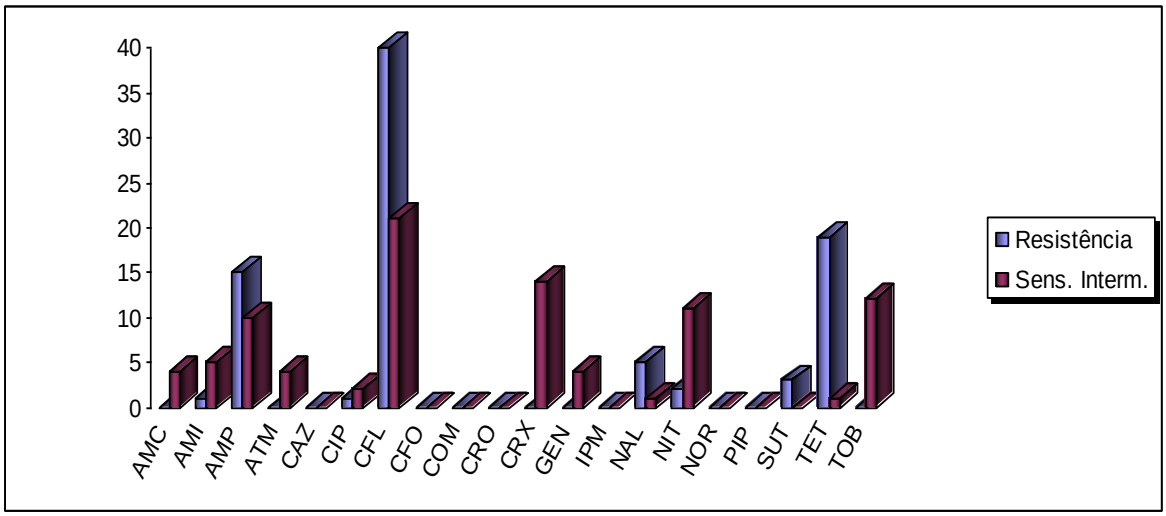


Figura 13 – Gatos diarréicos: Resistência e sensibilidade intermediária em cepas de origem fecal de *E.coli* isoladas de gatos diarréicos, entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto. R=Nº. de cepas resistentes; SI= Nº. de cepas sensibilidade intermediária.

.

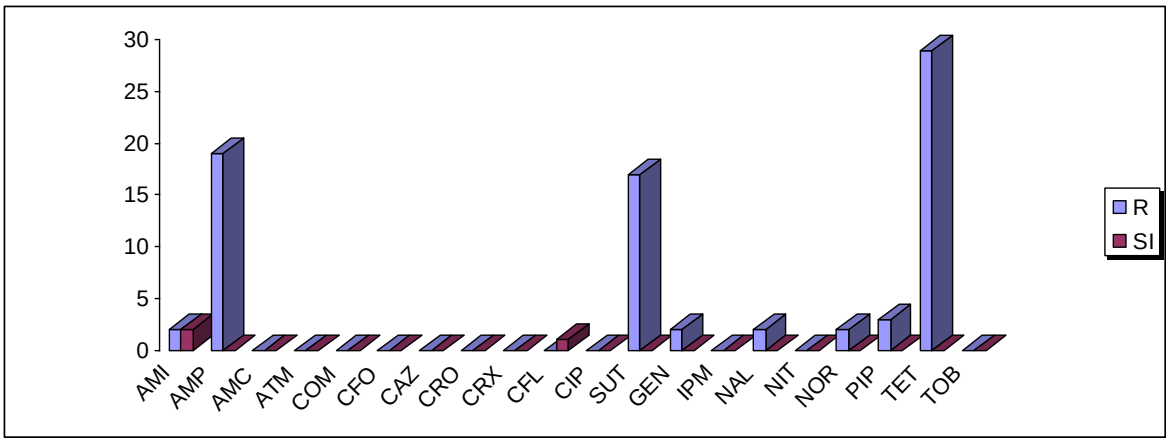


Figura 14 – Gatos saudáveis: Representação da resistência e sensibilidade intermediária em cepas de origem fecal de *E.coli* isoladas de gatos saudáveis, entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto. R=Número de cepas resistentes; SI= Número de cepas apresentando sensibilidade intermediária.

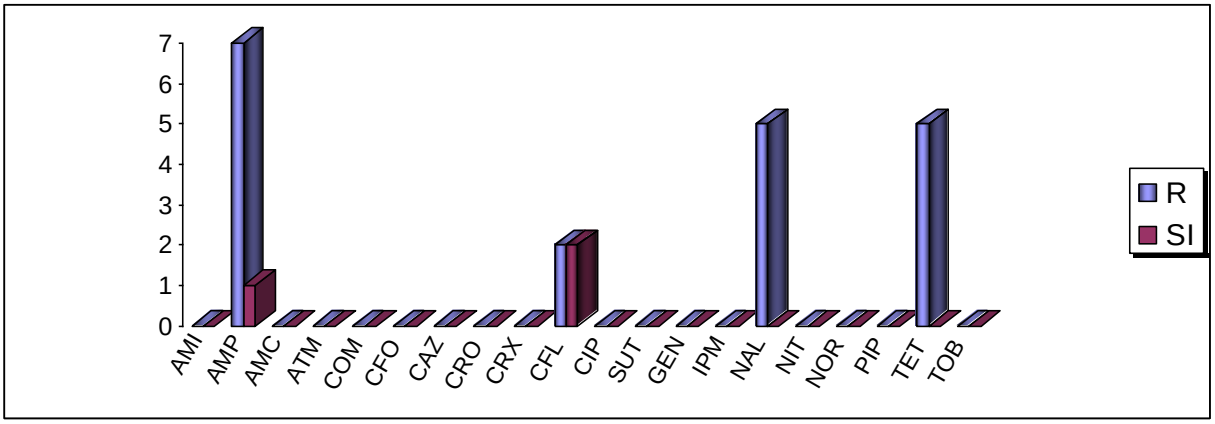


Figura 15 – Gatos com ITU: Resistência e sensibilidade intermediária em cepas de origem urinária de *E.coli* isoladas de gatos com sintomas de ITU, entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto. R=Número de cepas resistentes; SI= Número de cepas apresentando sensibilidade intermediária.

As associações entre a presença de genes codificadores de virulência, a sensibilidade, a resistência e a sensibilidade intermediária aos antimicrobianos em relação aos gatos saudáveis e diarréicos podem ser vistas na Tabela 13.

Tabela 13 – Presença dos genes *eae, pap e sfa* em relação à sensibilidade, sensibilidade intermediária e resistência a antimicrobianos entre gatos diarréicos e saudáveis, estudados na região de Ribeirão Preto, entre janeiro e dezembro de 2009. .

Genes	***Gatos Saudáveis***				***Gatos Diarréicos***			
	Nº	***S***	***R***	***SI***	***Nº***	***S***	***R***	***SI***
Pap	0	0	0	0	15	7	5	7
Eae	0	0	0	0	0	0	0	0
Sfa	12	2	10	0	25	5	18	12
pap+eae	0	0	0	0	0	0	0	0
pap+sfa	11	6	5	0	10	2	7	4
sfa+eae	0	0	0	0	5	0	5	5
Total	23	8	15	0	55	12	37	26

S= sensível; R= resistente; SI= sensibilidade intermediária; Nº= número de cepas apresentando genes de virulência.

A Tabela 14 apresenta a relação entre o número de animais no mesmo ambiente, os genes de virulência, a resistência e a sensibilidade intermediária para cepas de *E. coli* no grupo dos gatos saudáveis.

Tabela 14 – Relação entre número de animais no mesmo ambiente, genes de virulência, resistência, sensibilidade intermediária para cepas de *E. coli* no grupo dos gatos saudáveis, estudados entre janeiro e dezembro de 2009, na região de Ribeirão Preto.

Nº. de gatos vivendo com outros gatos	***Nº de Gatos***	***Nº de cepas T***	***Nº de cepas V***	***Nº de cepas R***	***Nº de cepas S. I***	***Nº de cepas S***
Até 2	8	37	7	12	0	28
Até 3	5	25	10	13	1	11
Mais de 3	6	25	10	13	2	11
Clínica	2	7	0	2	0	5

T= total de cepas; V= Nº. de cepas apresentando pelo menos um gene de virulência; R= Nº. de cepas resistentes; SI= Nº. de cepas com sensibilidade intermediária.

Os gatos criados isolados ou convivendo com até dois no mesmo ambiente apresentaram resistência antimicrobiana em 12 cepas e presença de genes codificadores de fatores de virulência em 7 de um total de 37 cepas. Os que viviam em grupos de 3 e os de grupos de mais de 3, apresentaram os mesmos resultados para resistência e genes de virulência, ou seja, 13 e 10 respectivamente de um total de 25 cepas.

Apenas dois gatos vivendo em clínicas veterinárias foram analisados, sendo que cada um residia em clínica localizada em cidades diferentes. De um deles foram isoladas 5 cepas de *E. coli*, sendo todas sensíveis aos 20 antimicrobianos testados. Do outro gato somente 2 cepas (das cinco isoladas de sua amostra fecal) foram identificadas como *E. coli,* sendo verificadas nas duas o fenótipo de multiresistência a ampicilina/ciprofloxacina/ácido nalidíxico/norfloxacina/ácido pipemídico/tetraciclina. Este número é extremamente pequeno para se fazer comparações, mas é interessante notar a multiresistência

apresentada para as quinolonas (CIP, NAL, PIP), betalactâmicos (AMP) e tetraciclina (TET) em gato vivendo em ambiente onde o uso de antimicrobianos é intenso. Para melhor visualização destes resultados utilizamos a figura 17.

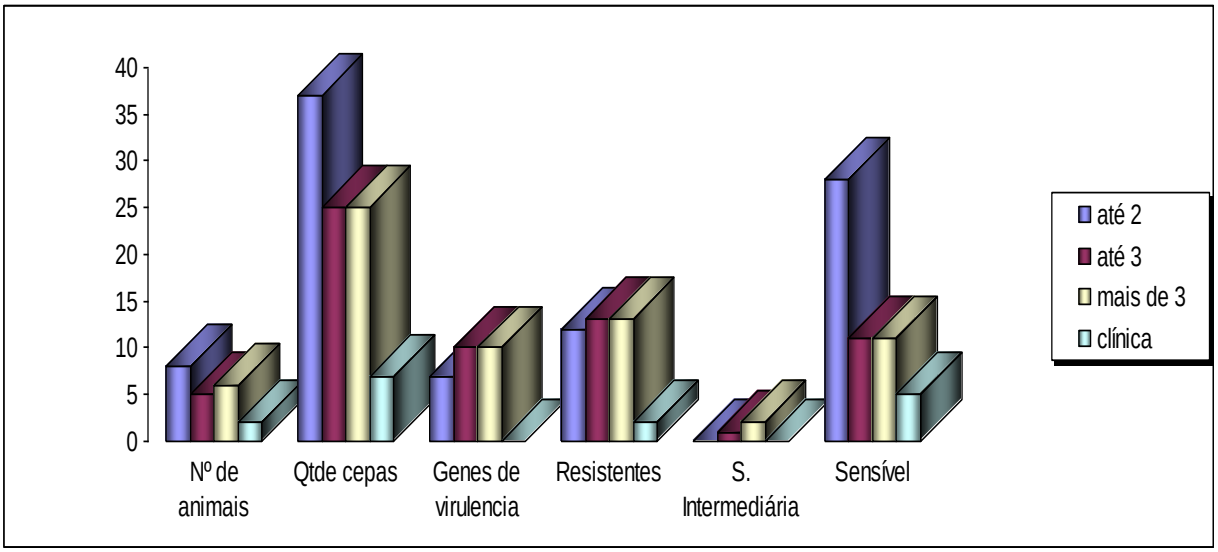


Figura 16 – Relação entre número de animais vivendo juntos e a presença de genes de virulência, resistência, sensibilidade intermediária e sensibilidade a antimicrobianos.

6 – DISCUSSÃO

Animais de estimação representam um papel importante na sociedade humana e inúmeros benefícios de ordem emocional ou física advêm da relação do homem com seus animais de companhia. Atualmente existem as chamadas terapias facilitadas por animais, onde estes são utilizados para ajudar na recuperação de vários tipos de dificuldades ou patologias físicas e mentais, melhorando consideravelmente as respostas aos tratamentos (SERPEL, 1993; BARAK et al, 2001; BARKER, 1999).

Diante desta realidade é importante a determinação dos riscos inerentes a tal convívio e a melhor forma de evitá-los. A bactéria *E. coli* é um importante micro-organismo, tanto por desempenhar funções junto à microbiota intestinal quanto por ser causadora de doenças da comunidade e nosocomiais, estando relacionadas principalmente às três síndromes clínicas: meningite neonatal/ septicemias, infecções do trato urinário e doenças intestinais.

A caracterização do micro-organismo envolvido nestas síndromes, bem como o conhecimento de seus mecanismos patogênicos e epidemiológicos é importante no controle e tratamento destas infecções, portanto o diagnóstico preciso do micro-organismo é um ponto fundamental. Para as Enterobactérias são definidas rotinas de isolamento e caracterização bioquímica que permitem identificar com um determinado percentual de segurança as amostras obtidas de isolados clínicos.

Neste trabalho encontramos uma inesperada variação para a fermentação da sacarose, para a descarboxilação da lisina, e para a produção de gás a partir da fermentação da glicose, embora para os outros testes como indol, urease, produção de H_2S, desaminação do triptofano tenham tido comportamento idêntico ao padrão bioquímico para *E. coli.*

O comportamento bioquímico atípico, que pode ser verificado nas tabelas 06 e 07, com elevado percentual de cepas sacarose negativas foi o que

inicialmente chamou a atenção, em seguida a verificação da ocorrência de 4,21%, 6,31% e 20% de cepas gás-lisina-sacarose negativas respectivamente do grupo de gatos diarréicos, saudáveis e com sintomas de ITU, apresentado na tabela 08, nos levou a investigar melhor o assunto e percebemos a possibilidade de se tratar de um tipo raro de *E. coli* denominada inativa ou Alkalescens-Dispar, que na década de 60 era considerada como pertencente ao gênero *Shiguella.*

Um dos mais antigos relatos a respeito de cepas Alkalescens-Dispar é de LEVINE & TANIMOTO (1953) que conduziram estudo sobre atividade antibacteriana (produção de colicinas) entre cepas de *Salmonela*, *Shigella*, *E. coli* e organismos então agrupados como Alkalecens-Dispar (AD) considerados como pertencentes ao gênero *Shigella* e acharam interessante que as propriedades antibacterianas do grupo Alkalescens pareciam ser mais relacionadas às do gênero *Escherichia* que às do gênero *Shigella*, tendo encontrado componentes antigênicos em comum com *Escherichia*. No Brasil, CANDEIAS et al (1968) pesquisando a relação de diarréia infantil com vários micro-organismos relataram o isolamento de *S. alkalescens*, já comentando que alguns pesquisadores a consideravam no gênero *Escherichia*. KAUFFMAN (1969) citou o grupo AD como patógenos oportunistas do trato urinário.

Embora sua ocorrência seja pouco relatada, alguns pesquisadores atentam para a importância de tais cepas, por vários motivos, um dos quais a possibilidade de serem confundidas com *Shigella*, levando a subestimar a prevalência de *E.coli* em estudos epidemiológicos, além de seu potencial de causar infecção do trato urinário. CRICHTON et al (1981) sugeriram testes da presença de hemaglutinina manose resistente MRHA (hemaglutinina manose resistente) para a diferenciação de *E. coli* inativa (AD) com *Shigella*. OLD & CRICHTON (1986) relataram a presença de fímbria *P* em todas as cepas AD dos sorogrupos O1 e O2, confirmando seu potencial como patógeno do trato urinário.

FAUNDEZ et al (1988) encontraram EIEC associada à diarréia infantil no Chile exibindo cepas com grande variação no padrão bioquímico, sendo muitas destas EIECs lisina negativa e imóveis. Também foi relatada uma alta capacidade

de invasão e multiresistência a antimicrobianos, atribuída à presença de um grande plasmídeo (120 MD).

BETIOLL et al (1994), pesquisando agentes etiológicos relacionados com SIDS (“Sudden Infantile Death Syndrome” - síndrome da morte infantil súbita) encontraram 16% de *E. coli Alkalescens-Dispar* em casos de SIDS em contraste com 4,5% no grupo controle (embora a síndrome não possa ser atribuída a um micro-organismo em particular, pois vários fatores estão presentes). O pesquisador chama a atenção para a dificuldade em reconhecer a *E. coli* inativa em rotinas de laboratório, uma vez que por suas características bioquímicas pode ser facilmente relatada como *Shigella*.

S0RESCU et al (2000) isolaram cepas de *E.coli Alkalescens-Dispar* em suínos com diarréia e descreveram o perfil bioquímico da cepa, caracterizando-o como imóvel, não produtor de gás a partir da fermentação da glicose, sacarose e lisina negativa e fermentadores tardios da lactose. Ao exame em microscópio eletrônico demonstraram possuir fímbrias, mas não flagelos. As cepas analisadas apresentaram resistência à tetraciclina, estreptomicina e cloranfenicol. Não foram detectadas enterotoxinas ST ou verotoxinas em nenhuma das cepas com as características bioquímicas acima citadas. O comportamento bioquímico de algumas cepas do presente estudo é semelhante ao do estudo comentado anteriormente, exibindo, portanto, características compatíveis com *E. coli* Alkalescens-Dispar. Além disso, as cepas deste estudo com as características semelhantes à *E. coli* AD, apresentaram genes *sfa* e *pap*, codificadores de fímbrias e não apresentaram genes *stx* codificadores de shigalike toxina.

Cepas de *E. coli* com capacidade invasora têm sido cada vez mais relacionadas com síndromes inflamatórias intestinais como a doença de Crohn. A presença do patógeno na microbiota de indivíduos com a doença, assim como a ocorrência de anticorpos específicos para *E.coli* invasiva é muito mais freqüente do que na população controle, embora estas síndromes sejam complexas e atribuídas à vários fatores, entre os quais características genéticas relacionadas à aspectos autoimunes (XAVIER & PODOLSKY, 2007; SASAKY et al, 2007).

As constatações anteriormente comentadas, ao lado das evidências de transferência horizontal de genes de virulência e resistência a antimicrobianos, ressaltam a importância de um maior conhecimento sobre a flora intestinal normal, tanto em relação à sua biodiversidade quanto às características intrínsecas dos micro-organismos que a compõem, como a determinação das suscetibilidades aos antimicrobianos e a presença de fatores de virulência. A resistência em bactérias da flora é menos estudada que em patógenos. No passado o foco de atenção era quase exclusivamente o mecanismo de resistência em bactérias patogênicas, entretanto, em muitos casos estes estudos possibilitam pouca informação sobre a origem e fonte de resistência aos antimicrobianos. Uma visão mais ampla deve incluir o estudo em bactérias não patogênicas e uma das questões a serem respondidas é quanto o desenvolvimento da resistência na flora normal está diretamente relacionado com o dramático aumento desta em patógenos.

A pressão seletiva exercida pelos antibióticos não é restrita apenas a organismos patogênicos. MOYAERT et al (2006) investigaram a prevalência de resistência antimicrobiana em diferentes populações de gatos e encontraram cepas resistentes e multiresistentes em gatos saudáveis. O presente estudo também verificou a presença de cepas resistentes entre os gatos saudáveis (34,7%), embora a prevalência destas tenha sido menor do que a do grupo de gatos diarréicos (54,7%) e com sintomas de ITU (60%).

Curiosamente, a resistência apresentada para ampicilina para os animais diarréicos (11,6%) foi menor que para os saudáveis (20%). Talvez tal fato se deva à presença da associação de resistência da ampicilina-cotrimoxazol-tetraciclina que ocorreu em 10 cepas isoladas a partir de 2 gatos saudáveis do mesmo proprietário, este percentual é próximo ao do encontrado por MOYAERT et al (2006) para ampicilina no grupo de gatos vivendo em gatis (25,6%). Os percentuais encontrados entre os gatos diarréicos deste estudo para ampicilina são próximos aos encontrados por Moyaert na população de gatos vivendo em residências como únicos animais de estimação (15,8%). Quanto à resistência à associação amoxacilina-ácido clavulônico houve concordância de resultados em

relação aos gatos saudáveis e com ITU do presente estudo e os grupos de animais de residência e de gatis encontrados pelos referidos autores, ou seja, todas as cepas destes animais foram suscetíveis à associação destes antimicrobianos. Entretanto os gatos diarréicos deste trabalho apresentaram 4,1% de sensibilidade intermediária à amoxacilina-ácido clavulônico. Os animais hospitalizados analisados por Moyaert e colaboradores apresentaram 18,2% de resistência a AMC.

AUTHIER et al (2006) e COSTA et al (2008) do Canadá também relataram uma porcentagem de resistência de cepas de *E. coli* isoladas de gatos saudáveis muito semelhante à relatada no presente estudo, especialmente para ampicilina, cefalotina e tetraciclina. A única exceção foi para a resistência ao cotrimoxazol que mostrou uma inesperada alta porcentagem de resistência (17,9%) entre as cepas de gatos saudáveis que foi completamente diferente dos dados relatados pelos autores acima mencionados, o que poderia indicar um uso inapropriado da droga na região deste estudo.

É interessante ressaltar que as cepas de *E. coli* isoladas tanto dos gatos diarréicos quanto dos saudáveis neste estudo mostraram, em geral, baixas porcentagens de resistência a aminoglicosídeos, cefalosporinas e quinolonas, o que pode ser uma informação importante por permitir uma terapia empírica segura para o tratamento de animais de estimação com estes antibióticos nesta região.

Ciclo de mútua infecção por *E. coli* patogênica entre gatos e humanos é possível, ainda que a dinâmica desta transmissão não seja bem entendida. Gatos domésticos podem ser colonizados por cepas carregando genes codificadores de fatores de virulência, já tendo sido descritos em gatos vários sorotipos de EPEC anteriormente identificados em humanos. MORATO et al (2008) encontraram grande similaridade genética entre cepas O111: H25 e O125: H6 isoladas de cães, gatos e humanos. Relataram ainda a presença do gene *eae* em várias cepas e não encontraram genes *stx*, nem cepas ETEC ou EHEC. No presente trabalho também encontramos o gene *eae* em 5 cepas isoladas de gatos com diarréia dentre as 205 analisadas nos três grupos de animais e podemos dizer que os

genes codificadores de virulência foram mais freqüentes entre as cepas dos gatos diarréicos que entre as dos saudáveis. Assim como em relação ao estudo anteriormente citado, não foram encontrados genes *stx* entre as cepas isoladas neste trabalho.

POPISCHIL et al (1987) descreveram dois casos de diarréia em gatos por cepas EPEC, confirmando o fenótipo “attaching-effacing”. ABAAS et al (1989) conseguiram determinar a associação de cepas VTEC (também chamadas STEC) com diarréia em gatos tendo encontrado diferença significativa em relação aos gatos saudáveis. Porém SMITH et al (1998) estudaram a prevalência de cepas STEC não tendo conseguindo estabelecer associação significativa com diarréia em gatos. Sorotipos previamente isolados em humanos e bovinos foram identificados nestas cepas, concluindo desta forma que gatos podem ser reservatórios de sorotipos STEC para humanos e bovinos.

BEUTIN, (1999) chamou a atenção para a alta correlação genética entre ExPECs isoladas de humanos, cães e gatos, porém encontraram padrões diferentes na adesão pelas fímbrias, sugerindo especificidade para hospedeiro que já era sugerida por MARKLUND et al (1992) baseados principalmente na existência de três diferentes classes de adesinas PapG. JOHNSON et al (2000; 2001) encontraram o alelo *pap*GIII em isolados de cistite de cães e de humanos, mostrando grande similaridade entre *E. coli* isoladas de infecções do trato urinário de homens e animais. FÉRIA et al (2001) demonstraram que cães e gatos com ITU compartilhavam fatores de virulência com *E. coli* de humanos com esta infecção. Mais recentemente, FREITAG, et al, (2004) observaram similaridades entre *E. coli* isoladas de gatos domésticos e *E. coli* causadora de sérias complicações extra intestinais em humanos.

As cepas analisadas no presente estudo, tanto resultantes dos isolados clínicos (diarréia e ITU) como as de gatos saudáveis apresentaram genes codificadores de fatores de virulência como os genes *pap* e *sfa* que codificam adesinas fimbriais, importantes na colonização do trato urinário e na determinação de enteropatogenicidade. O gene *eae* responsável por lesões do tipo “attaching-

effacing" foi encontrado apenas entre os animais diarréicos neste trabalho. O papel de cães e gatos como reservatórios de genes *eae* foi investigado por KRAUSE et al (2005) que encontraram uma prevalência de genes *eae* de 7,2% em cães e 6,5% em gatos sem sintomas clínicos, algumas destas cepas eram de sorotipos reconhecidos como patógenos de humanos. MORATO et al (2008) também citam gatos como reservatórios naturais de tipos enteropatogênicos de *E. coli* em humanos.

Embora o número de amostras urinárias tenha sido muito pequeno no presente estudo, está de acordo com a literatura que cita a dificuldade de isolamento bacteriano em gatos exibindo sintomas de infecções do trato urinário (KRUGER et al,1991; RECHE JUNIOR & HAGIWARA, 1998). As características do sistema urinário desta espécie dificultam a colonização por bactérias, uma vez que o pH da urina é baixo e a densidade bastante elevada. Desta forma, as doenças do trato urinário em gatos são mais de origem inflamatória, como por exemplo, pela presença de cálculos urinários, do que de origem infecciosa.

Porém, quando a etiologia é bacteriana, a *E. coli* é o micro-organismo prevalente. CORREIA et al (2007) relataram uma prevalência de *E. coli* em ITU de humanos de até 90%. PIMENTA et al (2007) relacionaram a bactéria em 89% das ITU em cães e 11% em gatos. RECHE JÚNIOR & HAGIWARA (1998) citaram o crescimento bacteriano em apenas 8% de amostras de origem urinária, e em trabalho mais recente (2005) o mesmo autor trabalhando com gatos que apresentavam afecções clínicas em outros sistemas além de sintomas de ITU, como por exemplo, diabetes, pancreatite e lipidose hepática, encontraram uma prevalência de 24,5% de crescimento bacteriano em cepas urinárias. DAVIDSON et al (1992) encontraram um percentual de 25% de crescimento bacteriano, bem próximo ao do autor anteriormente citado, porém trabalharam com cepas provenientes de gatos com idade média de 10,5 anos. Uma das três amostras urinárias do presente estudo foi proveniente de uma fêmea jovem exibindo sinais clínicos mais severos e não obviamente relacionados ao sistema urinário. Este animal apresentava acentuada icterícia, anorexia, e prostração. A urina foi

semeada em meio Mac Conkey apresentando intenso crescimento bacteriano, resistência a ácido nalidíxico, ampicilina e tetraciclina e foram observados genes de virulência *pap* e *sfa*.

Outro caso interessante observado foi um fenótipo de multiresistência em duas cepas isoladas do mesmo gato saudável que vivia em uma clínica veterinária. Estas cepas foram resistentes a ácido nalidíxico, ácido pipemídico, ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina, norfloxacina e tetraciclina. Dois aspectos podem ser considerados em relação a este caso: primeiro, a verificação de resistência em cepas isoladas de animal saudável está de acordo com vários autores como: LILENBAUM et al (2000), GUARDABASSI et al (2004), CARATTOLI et al (2005), MOYAERT et al (2006), que enfatizam que tanto bactérias patogênicas como as comensais da microbiota podem apresentar resistência antimicrobiana; segundo, em ambientes com alta pressão de seleção pelo uso intenso de antibióticos observa-se aumento da resistência (GUARDABASSI et al, 2004; ROSAS et al, 2006; REDONDO & ALONSO, 2007).

MOYAERT et al (2006) compararam vários grupos de gatos quanto ao ambiente e a presença de resistência ou multiresistência em cepas de *E.coli* tendo encontrado diferenças significativas entre animais domiciliados em residência particular e animais criados com vários outros em gatis, assim como em animais hospitalizados. Neste estudo foi observada uma maior tendência de resistência entre os animais vivendo em grupos maiores, porém para melhores conclusões quanto ao efeito do número de animais convivendo em um mesmo ambiente, novos estudos deverão ser conduzidos abrangendo um maior número de animais para que as comparações possam ser significativas.

REDONDO & ALONSO (2007) também associaram a pressão ambiental ao surgimento de resistência em cepas de *E*. *coli*. Analisaram isolados clínicos de humanos e encontraram cepas em áreas distantes do mesmo hospital carregando plasmídeos com padrões de restrição idênticos, contendo genes de resistência para os mesmos grupos de antibióticos, o que significa que além do uso intenso de antimicrobianos estar selecionando cepas resistentes, está ocorrendo também

transferência horizontal destes genes através de elementos genéticos mobilizados através de plasmídeos.

A associação entre o aumento de uso de antibióticos e a emergência de resistência antimicrobiana em animais de companhia foi bem documentada por GUARDABASSI et al (2004) em estudos retrospectivos conduzidos na Suíça, onde o aumento oficialmente registrado do uso de lincosamidas foi relacionado ao aumento de resistência em cepas de *Staphilococcus* isoladas de piodermite. Da mesma forma, nos EUA o aumento de uso de fluorquinolonas (de 1.334 g em 1995 para 2.358 g em 1996) em cães com ITU foi acompanhado pelo aumento de cepas de *E. coli* resistentes a esta classe de antibióticos bem como um aumento de multiresistência em outras bactérias Gram – em infecções nosocomiais de cães.

LILENBAUM et al (2000) no Brasil descreveram o primeiro caso de *Staphilococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) na flora de gatos saudáveis. A infecção parece ter ocorrido após a exposição destes animais à pessoas infectadas, além disso as cepas isoladas eram de sorotipos prevalentes em humanos, o que evidencia que estes gatos eram hospedeiros secundários. Tal fato demonstra que bactérias de origem humana podem ser transmitidas ao animal de estimação e este, por sua vez, pode adquirir genes de resistência de bactérias da microbiota que pode ainda ser selecionada através de tratamento antimicrobiano neste animal. Mesmo no caso de transmissão do homem para o animal, este último pode contribuir para a propagação da bactéria resistente através das fezes, disseminando-a na população humana e no ambiente.

O trabalho de ROSAS et al (2006) contribuiu para esclarecer as fontes de contaminação por bactérias resistentes. Foram analisadas amostras de poeira residencial e de ambientes externos quanto à presença de coliformes fecais, entre estes, *E. coli*, tendo sido encontradas mais unidades formadoras de colônia dentro do que no exterior de residências, principalmente naquelas com carpetes e animais de estimação. Porém as bactérias encontradas no exterior foram mais parecidas com sorotipos prevalentes em bactérias de origem humana, enquanto

no interior das residências as bactérias isoladas eram mais parecidas com as de origem animal. Sugerindo que em ambientes externos a maior fonte de contaminação é de origem humana, em contrapartida, em ambientes internos animais de companhia são as principais fontes de contaminação.

Cepas de *E. coli* MDR isoladas de cães apresentaram genes de resistência associados a integron classe I que tinham sido anteriormente descritos em bactérias isoladas de infecções clínicas em humanos (KANG et al, 2005). Isto sugere a disseminação de mecanismos comuns de resistência entre cepas de cães e homens, possivelmente através de co-seleção e transferência de plasmídeos de resistência à múltiplas drogas (TROTT et al, 2004).

Genes de resistência residentes em integron classe I já foram registrados em *E. coli* isoladas de gatos saudáveis (COSTA et al, 2008). Integrons são importante mobilizadores de genes em *E. coli*, mas não são estavelmente mantidos sem pressão de seleção por não existir similaridade suficiente no códon de uso preferencial entre a bactéria hospedeira e o integron. A similaridade é suficiente apenas para permitir a inserção do integron no genoma bacteriano, mas não suficiente para sua fixação sem a presença de um fator que selecione estes genes contidos no integron, como por exemplo, a presença de antimicrobianos em relação a genes de resistência associados a estes elementos móveis. Uma vez cessada a pressão representada pelo uso do antimicrobiano estes integrons são perdidos.

A análise bioinformática permitiu concluir a instabilidade de integrons classe I em *E. coli* e demonstrar que esta e outras Enterobactérias têm adquirido e perdido integrons e integrases muitas vezes durante a evolução. Cepas não clínicas de *E. coli* são relatadas como tendo menor capacidade de ganhar integrons classe I, o que pode ser devido à suas características intrínsecas. Porém, também é possível que a natureza plasmidial de integrons em *E. coli* e as diferenças de códon de uso preferencial de integrons e suas integrases em relação ao genoma de *E.coli* faça com que estes elementos móveis sejam instáveis. Desta forma, na ausência de pressão seletiva, integrons carregando

genes codificadores de resistência são facilmente perdidos. Isto reforça a importância representada pelo uso de antimicrobianos em relação à resistência.

A resistência de espectro ampliado aos betalactâmicos (ESBL) em cepas de *E. coli* isoladas de cães e gatos tem sido relatada por diversos autores (FÈRIA et al, 2002; WARREN et al, 2001; CARATTOLI et al, 2005; DOMINGOS et al, 2009) e constitui uma preocupação muito grande para a saúde pública, uma vez que estes antimicrobianos são agentes terapêuticos eficazes em infecções significativas. Felizmente, o presente trabalho não detectou este tipo de resistência entre os grupos de gatos estudados.

O uso de antimicrobianos deve seguir protocolos criteriosos para ajudar a conter a resistência. Diagnóstico seguro do micro-organismo envolvido nas infecções da comunidade ou nosocomiais é uma importante etapa deste processo. Além disso, atualizações constantes sobre o estado de resistência aos antimicrobianos mais utilizados na medicina veterinária são necessárias.

O rastreamento do movimento dos genes de resistência e melhores conhecimentos sobre as rotas de transmissão tanto de bactérias comensais, como de patogênicas, entre animais e seres humanos que vivem em contato são aspectos difíceis de ser totalmente esclarecidos, porém são de fundamental importância se a resistência e organismos resistentes devem ser controlados. Para isto esforços nacionais e internacionais devem ser mobilizados e uma vigilância epidemiológica eficiente precisa ser constantemente mantida.

Mais estudos deverão ser realizados no futuro, a fim de acompanhar a evolução da virulência e da resistência antimicrobiana entre cepas de *E. coli* de animais de estimação.

7 – CONCLUSÕES

✓ Foram identificadas 205 cepas de *E. coli* provenientes de amostras de três grupos de gatos: 21 diarréicos, 19 saudáveis e 3 com sintomas de infecção urinária (ITU).

✓ Os genes codificadores de adesinas (*sfa* e *pap*) foram encontrados nas cepas isoladas dos três grupos, porém foram mais freqüentes entre as cepas dos gatos diarréicos, sendo que o gene *sfa* ocorreu em maior abundância.

Foram encontradas cepas com potencial de causar lesões do tipo "attaching-effacing" entre os gatos diarréicos determinadas pela presença do gene *eae*, que foi verificado apenas neste grupo e sempre associado ao *sfa*.

O gene *pap* ocorreu isolado ou associado ao *sfa* entre as cepas dos diarréicos, nos demais grupos apresentou-se associado ao *sfa*.

Nenhuma das cepas apresentou os genes stx_1 e stx_2, não sendo, portanto caracterizadas como enterotoxigênicas. O gene *afa*, codificador de adesinas afimbriais, também não foi encontrado.

✓ As cepas dos gatos saudáveis apresentaram maiores suscetibilidades aos antimicrobianos testados que as dos diarréicos. Os gatos com ITU apresentaram 40% de cepas sensíveis.

A sensibilidade intermediária foi maior entre os animais diarréicos que entre os saudáveis, o que contribuiu para a baixa susceptibilidade nesta categoria.

Fenótipos de multiresistência, caracterizados como a resistência a 3 ou mais antibióticos foram encontrados nos isolados dos 3 grupos, sendo o fenótipo ampicilina-cotrimoxazol-tetraciclina prevalente entre os diarréicos e o fenótipo ampicilina-ácido nalidíxico-tetraciclina o mais freqüente tanto entre os saudáveis como nos com sintomas de ITU.

✓ Não foi verificada resistência do tipo ESBL entre as cepas isoladas no presente estudo.

✓ Variação na fermentação da sacarose, na descarboxilação da lisina, e na produção de gás a partir da fermentação da glicose em relação ao padrão

bioquímico esperado para a *E*. *coli* sugestiva de *E. coli* Alkalescens-Dispar, um tipo raro de *E. coli* invasiva, também chamada inativa, que tem sido relacionada com importantes afecções clínicas em humanos e anteriormente a este estudo somente verificada em suínos.

- ✓ Os estudos de vigilância bacteriológica são métodos de grande utilidade para se determinar as tendências de sensibilidade microbiana das bactérias. São estudos de validade temporal devido à capacidade das bactérias em desenvolver mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Essa realidade pressupõe a necessidade de estudos continuados de sensibilidade bacteriana, especialmente para *E. coli*, visando aumentar a eficiência de protocolos terapêuticos.
- ✓ A possibilidade de transmissão cruzada de genes condicionadores de virulência e de resistência à antimicrobianos entre homens e animais ressaltam a necessidade do uso racional de antibióticos e de medidas de higiene no contato com os animais de estimação.

8 - REFERÊNCIAS

ABAAS, S.; FRANKLIN, A.; ORKOV, F. Cytotoxin activity on Vero cells among *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in cats. **Am. J. Vet. Res**., v. 50, p. 1294-1296, 1989.

ANDERLINI, G.P.O.S.; ANDERLINI, G.A. Benefícios do envolvimento do animal de companhia (cão e gato), na terapia, socialização e bem estar das pessoas e o papel do médico veterinário**. Revista CFMV, Brasília/DF**. Ano XIII, nº. 41, 2007.

AUTHIER, S.; PAQUETTE, D.; LABREQUE, O. ; SERGE, M. Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacteria isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart. **Can. Vet**., v. 47, p. 774-778, 2006.

AZIZ, R.K. A hundred-year-old insight into the gut microbiome! **Gut Pathogens**, 2009, 1:21.

BARAK, Y.; SAVORAI, O.; MAVASHEV, S.; BENI, A. Animal-assisted therapy for elderly schizophrenic patients. *American* **Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 9, p. 439-422, 2001.

BARKER, S.B. Therapeutic aspects of the human-companhion animal interaction. **Psychiatrics Times**. Mineapolis, v. XVI, 1999.

BARTGES, J.W. Diagnosis of urinary tract Infeccions. **The Veterinary clinics of North America: Small animals practice.** , v. 34, n. 4, p. 923-933, Jul., 2004.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERVIES, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pahology**, v.45, p.493-496, 1966.

BELL, B.P.; GOLDOFT, M.; GRIFFIN, P.M. A multistate outbreak of Escherichia coli O157: H7 associated bloody diarrhea an hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. **The Journal of the American Medical Association,** Chicago, v. 272, p. 1349-1353, 1994.

BETTELHEIM, K.A. Non-O157 verotoxin-producing *Escherichia coli*: a problem, paradox, and paradigm. **Exp. Biol. Med***.,* v*.* 228, p. 333–344, 2003.

BETTIOL, S.S.; RADCLIFF, F.J.; HUNT, A.L.C.; GOLDSMID, J.M. Bacterial flora of Tasmanian SIDS infants with special reference to pathogenic strains of Escherichia coli. **Epidemiol. Infect**.,112, 275-284, 1994.

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

BLANCO, J.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; BLANCO, J.E.; GONZÁLEZ, E.A.; GARABAL, J.I. Characteristics of haemolytic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1). **Res. Microbiol***.,* v. 143, p. 869-878, 1992.

BLANCO, J.; BLANCO, M**.** *Escherichia coli* enterotoxigenicos, necrotoxigenicos y verotoxigenicos de origen humano y bovino: patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. **Lugo**: Edita, 1993.

BOWER, J. M; ETO, D.S.; MULVEY, A. A Covert operation of Uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. **Traffic**, v .6, p 18-31, 2005.

BRIGANTE, G.; LUZZARO, F.; PERILI, M.; LOMBARDI, G.; COLI, A.; ROSSOLINI, G.M.; AMICISANTE, G.; TONIOLO, A. Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of Escherichia coli infecting hospital and community patients. **Int J Antimicrob Agents**. Feb; 25 (2):157-162, 2005.

BRITO, B.G.; LEITE, D.S.; LINHARES, R.E.; VIDOTTO, M.C. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. **Vet. Microbiol***.,* v.65, p.123-132, 1999.

BURGESS, M.N., BYWATER, R.J., COWLEY, C.M. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. **Infect. Immun.**, v.21, p.526-531, 1978.

BURROWS, C.F. Diarrhea in kittens and young cats. In: AUGUST, J.R. **Consultations in feline internal medicine**. Philadelphia: WB Saunders Co., p. 415-418, 1991.

BUSCH, U.; HÖRMANSDORFER, S.; SCHRANNER, S.; HUBER, I.; BOGNER, K-H.; SING, A. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* excretion by child and her cat. **Emerg. Infect. Dis**., v. 13, n. 2, p. 348–349, Feb., 2007.

BUSSOTI, E.; LEÃO, E.R.; CHIMENTÃO, D.M.N.; SILVA, C.P.R. Assistência individualizada: “posso trazer meu cachorro?”. **Revista da Escola de Enfermagem da USP,** São Paulo, v.39, n.2, p. 21-27, 2005.

CANDEIAS, J.A.N.; IARIA, S.T.; CHRISTOVÃO, D.A.; SCHMID, A.W.; TAUNAY, A.E., COTILLO, L.G. Pesquisa de enterobacteriáceas e enterovirus em crianças normais e com quadros diarréicos agudos. **Rev. Saúde Pública.**, São Paulo, v.2, nº.2, Dec., 1968.

CAPRIOLI, A. FALBO, V.; RODA, L.G.; RUGGERI, F.M.; ZONA, C.. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. **Infect. Immun**., Washington, v.39, n.3, p.1300-1306, 1983.

CARATTOLI, A.; LOVARI, S.; FRANCO, A.; CORDARO, G.; DI MATTEO, P.; BATTISTTI, A. Extended-spectrum β- lactamase in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. **Antimicrob. Agents Chemother**., v. 49, p. 833-835, 2005.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standars for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2007.

CHINA, B., PIRSON, V., MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes.**Applies and Environmental Microbiology**, v.62. p. 3462-3465, 1996.

CLARKE, S.C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* – an emerging problem? **Diagnostic Microbiology & Infectious disease.** V. 41, issue 3, p. 93-98, nov. 2001.

CONFER, A.W.; PANCIERA, R.J. Sistema urinário. In: CARLTON, W.W.; Mc GAVIN, M.D. (Ed.). **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2. ed. São Paulo: Artmed, p. 228-265, 1998.

CORREIA, C.; COSTA, E.; PERES, A.; ALVES, M.; POMBO, G.; ESTEVINHO, L. Etiologia das infecções do tracto urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos. **Acta Med. Port***.,* v. 20, p. 543-549, 2007.

COSTA, D.; POETA, P.; SAENZ, Y et al. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. **Vet. Microbiol**.,v. 127, p. 97-105, 2008.

CRICHTON, P.B.; IP, S.M.; OLD, D.C. Hemagglutinin typing as an aid in identification of biochemically atypical *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 14599-145603, 1981.

CUNNINGHAM, C.W. Is congruence between data partitions a reliable predictor of phylogenetic accuracy? Empirically testing an interative procedure for choosing among phylogenetic methods. **Systematic Biology***,* v. 46, p. 464-478, 1997.

CZECZULIN, J.R.; WHITTAM, T.S.; HENDERSON, I.R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J.P. Phylogenetic Analysis of Enteroaggregative and Diffusely Adherent *Escherichia coli*. **Infec. Immun***.,* v. 67, p. 2692-2699, 1999.

DALMARCO, E. M.; BLATT, S. L.; CÓRDOVA, C. M. M. Identificação Laboratorial de beta,-Lactamase de Espectro Estendido (ESBLs) – Revisão. **RBAC**, v. 38, n. 3, p. 171-177, 2006.

DAVID, B. H.; ZHI-DONG, J.; HERBERT L. D. Illness in Travelers from the United States to Mexico. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., v. 69, n. 5, p. 506-508, 2003.

DAVIDSON, A.P.; LING, G.V.; STEVENS, F.; FRANTI, C.E. Urinary tract infection in cats: A retrospective study, 1977-1989. **California Veterinarian**, v.46, n.5, p.32-34, 1992.

DE REE, J.M.; SCHWILLENS, P.; VAN DEN BOSCH, J.F. Monoclonal antibodies that recognize the P fimbriae F7, F9 and F11 from uropathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun,** v.50, n.12, p.900-904, 1985.

DESAI, A. R.; MUSIL, K. M.; CARR, A. P.; HILL, J. E. Characterization and quantification of feline fecal microbiota using cpn60 sequence-based methods and investigation of animal-to-animal variation in microbial population structure. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 120-128, 2009.

DEVINE, D.A.; ROBERTS, A.P. K1, K5 and O antigens of *E. coli* in relation to serum killing via the classical and alternative complement pathways. **J Med Microbiol, England**, v.41, n.2, p.139-144, 1994.

DIAS, R. A.; GARCIA, R.C.; SILVA, D.F.; AMAKU, M.; NETO, J.F.S.; FERREIRA, F. Estimativas de populações canina e felina domiciliadas em zona urbana do Estado de São Paulo. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 4, n. 38, p. 565-570, 2004.

DÍAZ-MEJÍA, J. J.; AMABILE-CUEVAS, C. A.; ROSAS,I.; SOUZA,V. An analysis of the evolutionary relationships of integron integrases, with emphasis on the prevalence of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from clinical and environmental origins. **Microbiology**, v.154, 94–102, 2008.

DOMINGOS, D. F.; SIQUEIRA, A.K.; PESSOA, M.L.T.M.; GARCIA, M.R.; LEITE, D.S. Detecção dos genes BLA TEM, - CTX-M e SHV e integrons de classes 1 e 2 em cepas de *Escherichia coli* isoladas de cães. In: **25º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, *Resumo*, Pernambuco, nov. 2009.

DONNENBERG, M. S., RODNEY, A. W. Virulence determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. In: MOBLEY, H.L.T., WARREN, J.W. (EDS.), **Urinary tract infections, Molecular Pathogenesis and Clinical Management.** ASM Press, WASHINGTON, D. C., 1996. pp.135-174.

EDWARDS, P.R.; EWING, W.H. **Identification of enterobacteriacea**, 3. ed. Minneapolis: Burges, 1972.llfl

EDWARDS, C.A.; PARRET, A.M. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. **Br. J. Nutr**., v. 88, n. 1, p.S11-S18, 2002.

ETTINGER, S. J.; FELDMANN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2. p. 126-131, 2004.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIESSLING, S.; ALT, K.; ANTÃO, E.M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEEIR, T. ; BÖHNKE, U. ; STEINRÜCK, H. ; PHILIPP, H.C. ; WIELER, L.H. Avian pathogenic, uropathogenic, newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely relatede are they ? **Int. J. Med. Microbiology.,** v. 297, p. 163-176, 2007.

FARACO, C. B.; SEMINOTTI, N. A relação homem-animal e a prática veterinária. **Revista CFMV Conselho Federal de Medicina Veterinária**, ano X, n. 32, p. 57-61, maio/jun./jul./ag., 2004.

FAUNDEZ, G.; FIGUEROA, G.; TRONCOSO, M.; CABELLO, F.C. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Chile. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 928-932, May, 1988.

FÉRIA, C.; MACHADO, J.; CORREIA, J.D.; GONÇALVES, J.; GAASTRA, W.Virulence genes and P fimbriae PapA subunit diversity in canine and feline Uropathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p. 81-89, 2001.

FERIA, C.; FERREIRA, E.; CORREIA, J.D.; GONÇALVES, J.; CANIÇA, M. Patterns and mechanisms of resistance to B-lactams and B-lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. **J. Antimicrob. Chemother**., v. 49, p. 77-85, 2002.

FOXMAN, B.; MANNING, S.D.; TALLMAN, P.; BAUER, R.; ZHANG, L.; KOOPMAN, J.S.; GILLESPIE, B.; SOBEL, J.D.; MARRS, C.F. Uropathogenic *Escherichia coli* are more likely than commensal *E. coli* to be shared between heterosexual sex partners. **Am. J. Epidemiol**., v. 156, p. 1133–1140, 2002.

FOXMAN**,** B**.** Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. **Dis. Mon**. 49**:**53-70, 2003.

FRANCO, R.M.; MANTILLA, S.P.S.; GOUVEIA, R.; OLIVEIRA, L.A.T. Ocorrência de *Escherichia coli* em suínos abatidos nos Estados de Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina utilizando diferentes metodologias de isolamento. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**., v. 103, p. 209-218, 2008.

FRANK, D. N.; PACE, N. R. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. **Curr. Opin. Gastroenterol***,* January, v. 24, n. 1, p. 4-10, 2008.

FREITAG, T.; SQUIRES, R.A.; SCHMID,J.; ELLIOTT, J. Feline Uropathogenic *Escherichia coli* from Great Britain and New Zeland have dissimilar virulence factor genotypes. **Veterinary Microbiol**., p. 10679-10686, 2004.

FRÖLICHER, E.; KRAUSE, G.; ZWEIFEL, C.; BEUTIN, L.; STEPHAN, R. Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep. **BMC Microbiology,** 2008, **8**:144. http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/144. Acessado em 26/04/2010.

GREENE, C.E. Enteric bacterial infeccions. In: **Clinical microbiology and infeccious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: WB Saunders, p. 617-632, 1984.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **J. Antimicrob. Chemother**. , v. 54, p. 321-332, 2004.

GUARNER, F., MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease**.** ***Lancet***, v. 361, p. 512-519, 2003.

GUPTA, S.K. ; KECK J, RAM PK, CRUMP JA, MELERL MA, MINTZ, ED. Enteric Diseases Epidemiology Branch. National Center for Zoonotic, Vectorborne, and Enteric Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA. Disponível em: <scg7@cdc.gov>. Acesso em: 10 janeiro 2010.

GYLES, C.L.; BARNUM, D.A. A heat-labile enterotoxina from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. **J .Infect Dis,** v. 120, p. 419-426, 1969.

GYLES, C.L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Can. J. Microbiol***.*, v.38, p.734-746, 1992.

GYLES, C.; FAIRBROTHER, J. *Escherichia coli* In: GYLES, C.; THOEN, O.; PRESCOTT, J.; (Editors). **Pathogenesis of bacterial infeccion in animals**. AMES. Iowa State University Press: p 193-214, 2004.

HAMMERMUELLER, J.; KRUTH, S.; PRESCOTT, J.; GYLES, C. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. **Can. J. Vet. Res**., v. 59, p. 265-270, 1995

HUGHES, C.; PHILLIPS, R.; ROBERTS, A.P. Serum resistance among *E. coli* strains causing urinary tract infection in related O type and carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants. **Infect Immun,** Washington, v.35, p.270-275, 1982.

HUPPERTZ, H.I.; RUTKORWSKI, S.; ALEKSIC, S.; KARCH, H. Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe. **Lancet,** v. 349, p. 1660-1662, 1997.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

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

JOHNSON, J.R.; DELAVARI, P. Concurrent fecal colonization with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a homosexual man with recurrent urinary tract infection and in his male sex partner. **Clin. Infect. Dis**., v. 35, p. E65-E68, 2002.

JOHNSON, J. R., O`BRYAN, T.T., LOW, D.A., LING, G., DELAVARI, P., FASCHING, C., RUSSO, T.A, CARLINO, U., STELL, A.L. Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains that express *pap*G allele III. **Infect. Immun**. 68 (6): 3327-36, 2000.

JOHNSON, J.R.; STELL, A.L.; DELAVARI, P.; MURRAY, A.C.; KUSKOWASKI, M.; WIM G. Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. **J. infect. Dis**., v. 183, p. 897-906, 2001 a.

JOHNSON, J.R.; STELL, A.L.; DELAVAI, P. Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun**., v. 69, p. 1306-1314, 2001b.

KANG, H.Y.; JEONG, Y.S.; OH, J.Y.; TAE, S.H.; CHOI, C.H.; MOON, D.C.; LEE, W.L.; LEE, Y.C.; SEOL, S.Y.; CHO, D.T.; LEE, J.C. Characterization of antimicrobial resistance and class I integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. **J. Antimicrob. Chemother**., v. 55, p. 639-644, 2005.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev.**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KAUFFMAN, S. A. Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets, **J. Theor. Biol**., v. 22, p. 437-467, 1969.

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.

KONOWALCHUCK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero response to cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun**., v. 18, n. 3, p. 774-779, 1977.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive Escherichia coli types. **Vet. Microbiol**., v. 106, p. 87-95, 2005.

KRUGER, J. M., OSBORNE, C.A., GOYAL, S.M., WICSTRON, S.L., JOHNSTON, G.R., FLETCHER, T.F., BROWN, P.A. Clinical evaluation of cats with lower urinary tract disease. **J. Am. Vet. Med. Assoc**. 199,211-216, 1991.

KUHNERT, P., BOERLIN, P. E FREY, J. Target genes for virulence assessment of Escherichia coli isolated from water, food or environment. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, p. 107-117, 2000.

LE BOUGUENEC, C.L.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. 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, p. 1189-1193, 1992.

LEENER, E.D.; DECOSTERE, A.; GRAFF, E.M.D.; MOYAERT, H.; HAESEBROUCH Presence and mechanism of antimicrobial resistance among enterococci from cats and dogs. **Microb. Drug Resist**., v. 11, p. 395-403, 2005.

LEES, G.E. et al. Results of analyses and bacterial culture of urine specimens obtained from clinically normal cats by three methods. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.184, n.4, p.449-454, 1984.

LEY, R.E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; TURNBAUGH, P.J.; RAMEY, R.; BIRCHER, J.S.; SCHLEGEL, M.L.; TUCKER, T.A.; SCHRENZEL, M.D.; KNIGHT,

R.; GORDON, J.I. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. **Science** 20 June:Vol. 320. no. 5883, pp. 1647 – 1651, 2008.

LEVY, C.A. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**.** Edição Comemorativa para o **IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar Salvador, 30 de agosto a 3 de setembro de 2004 – Editora: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.**

LEVINE, M.; TANIMOTO, R. H. Antagonisms among enteric pathogens and coliform bacteria. **J. Bact***.,* v. 67, p. 537-41, 1954.

LIÉVIN, V.; PEIFFER, I.; HUDAULT, S.; ROCHAT, F.; BRASSART, D.; NEESER JR, SERVIN, A. L. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. **Gut Pathogens**, 47:646-52. 2000.

GUTH, B.E.C., CHINEN, I., MILIWEBSKY, E., CERQUEIRA, A.MF., CHILLEMI, G. ANDRADE, JR.C., BASCHKIER, A., RIVAS, M. Serotypes and Shiga toxin genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil. **Veterinary Microbiology**, 92, 335-349, 2003

LILENBAUM, W.; VERAS, M.; BLUM, E.; SOUZA, G.N. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 42-45, 2000.

LISTER, A.; MOSS, S.; PLATELL, J.; TROTT, D.J. Occult bacterial lower urinary tract infections in cats—Urinalysis and culture findings. **Veterinary Microbiology**. , v. 136, p. 130–134, 2009.

LOMAR, A.V.; DIAMENT, D. **Guia de terapia antiinfecciosa**, v. 1, p.11-44, 1998.

LUND, B.; MARKLUND, B.L.S.; STROMBERG, N.; LINDERBEG, F.; KARLSSON, K.A.; NORMAK, S. Uropathogenic *Escherichia coli* can express serologycally identical pili of different receptor binding specificities. **Mol. Microbiol***.*, v. 2, n. 2, p. 255-263, 1988.

MANGES, A.R.; JOHNSON, J.R. ; FOXMAN, B. ; O'BRIAN, T.T. ; FULLERTON, KE. ; RILEY, L.W. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. **N. Engl. J. Med**., v. 345, p. 1007-1013, 2001.

MARKLUND, B.L.; TEMNENT, J.M.; GARCIA, E. Horizontal gene transfer of *Escherichia coli* pap and prs pili operons as a mechanisms for the development of tissue adhesive properties. **Mol. Microbiol***.*, v. 6, p. 2225-2242, 1992.

MAYER, H.B.; WANKE, C.A. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a possible cause of diarrhea in an HIV-infected patient. **N. Engl. J. Med**., v. 332, p. 273-274, 1995.

MELO, S.K. Caracterização de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de lagoas do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais. 2006. 122 f. **Tese** (Mestrado em Engenharia Ambiental) – **Universidade Federal de Ouro Preto.**

MIDVEDT A.C.; CARLSTEDT-DUKE, B.; NORIN, K.E.; SAKERHOLT, H.; MIDVEDI, T. Development of five metabolic activities associated with the intestinal microflora of healthy infants. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 7, p. 559-567, 1988.

MORATO, E.P.; LEOMIL, L.; BEUTIN, L.; KRAUSE, G.; MOURA, R.A.; CASTRO, A.F.P. Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* Types. **Zoonoses Public Health**, v. 56, p. 229-237, 2008.

MORRIS, J.A. Escherichia coli fimbrial adhesins. Pig News an Information, v.4, n 1; p. 19-21, 1983.

MOYAERT, H.; De GRAEF, E.M.; HAESEBROUKE, F.; DECOSTERE, A. Acquired antimicrobial resistance in the intestinal microbiota of diverse cat populations**. Research in Veterinary Science** .v. 81, p.1-7, 2006.

MOYAERT, H. et al. Prevalence of *Helichobacter equorum* in feccal samples from horses and homans. **Vet. Microbiol**., v. 121, p. 378, 2007.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NATARO, J.P.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.D.; VIAL, P.A.; SEARS, C.L. T84 células em cultura como um modelo para enteroagregativa *Escherichia coli* patogênese. **Infect. Immun**., v. 64, p. 4761-4768, 1996.

NAVANEETHAN, U.; RALPH, A.G.; Mechanisms of infectious diarrhea. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. v.5, 637-647. nov. 2008.

NETA, J. H. Consciência animal. **Revista CFMV Conselho Federal de Medicina Veterinária,** ano X, n. 31, p. 59-65, jan./fev./mar./abril, 2004.

NGUYEN, R.N.; TAYLOR, L.S.; TAUSCHEK, M.; ROBINS-BROWNE, R.M. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerg. Infect. Dis**., v.12, p. 597-603, 2006.

OCHMAN, H. ; LAWRENCE, J.G.; GROISMAN, E.A.. Lateral transferência do gene e a natureza da inovação bacteriana. **Natureza***,* v. 405, p. 299-304, 2000.

OLD, D. C.; CRICHTON, P.B. P fimbriation among biochemically inactive strains of *Escherichia coli* of the group formerly called Alkalescens- Dispar. **J. Med. Microbiol**., v.21, p. 337-342, 1986.

OLIVA, S. A terapia assistida por animais: o papel do médico veterinário. **Boletim Informativo ANCLIVEPA-SP***,* São paulo*, n. 35, 2004.*

ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; BIRCH-ANDERSEN, A.; KANAMORI, M.; SVANBORG-EDEN, C. O, K, H and fimbrial antigens in *Escherichia coli* serotypes associated with pyelonephritis and cystitis. **Scand. J. Infect***. Dis.*, v. 33, p. 18-25, 1982.

OSBORNE, C. A. et al. Urinary tract infections: normal and abnormal host defense mechanisms. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 9, n. 4, p. 587-609, 1979.

OSBORNE, C. A & STEVENS, J.B. Feline lower urinary tract disorders. In : ETTINGER, S. J. (ed.). **Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat***.* 3. ed., Philadelphia: Saunders, 1989.

PASS, M.A., ODEDRA, R.; BATT, R. M. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. **J. Clin. Microbiol***.,* v. 38, p. 2001-2004, 2000.

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev***.*, v. 11, p. 450-479, 1998.

PAULA, C.J.S. Análise de cepas de *Escherichia coli* Shiga toxigênica (STEC) e *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) isoladas de cachorros diarréicos atendidos e clínica privada no Município de Ituverava, SP. **Tese** (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV UNESP Jaboticabal, 96 f., 2007.

PELCZAR JUNIOR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia,conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: **Makron Books do Brasil**, v.2, p.111-
125, 1997.

PESSOA, G.V.A.; SILVA, E.A.M. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. **Revista do Instituto Adolfo Lutz,** v. 32, p. 97-100, 1972.

PICARD, M., M. PLOUZEAU, J. E M. FAURE. Uma abordagem do comportamento de frangos de corte de alimentação. **Ann. Zootech**., v. 48, p. 233-245, 1999.

PIMENTA, E.; CALHOUN, D.A.; OPARIL, S. Mechanisms and treatment of resistant hypertension. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. 6, p. 604-13, 2007.

POLZIN, D. J. Management of recurrent bacterial urinary tract infections. **Compend. Cont.** *Ed.*, v. 16, p. 1565-1570, 1994.

POLZIN, D. J. Insuficiência Renal Crônica. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1997. p. 2394-2431.

POPISCHIL, A.; MAINIL, J.G.; BALJER, G.; MOON, H.W. Attaching and effacing bacteria in the intestines of calves and casts with diarrhea. **Vet. Path**., v.24, p. 330-334, 1987.

RAHMAN, M.M.; HAQ, J.A.; HOSSAIN, M.A.; SULTANA, R.; ISLAM, F.; ISLAM, A.H. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in an urban hospital in Dhaka, Bangladesh. **Int J Antimicrob Agents**. 2004 Nov;24(5):508-10.

RASTALL, R. A. Bacteria in the Gut: Friends and Foes and How to Alter the Balance. In: WALTHAM International Science Symposium: Nature, Nurture, and the Case for Nutrition**The Journal of Nutrition**, American Society for Nutritional Sciences, 134 (8): 2022S, 2004.

RECHE JR, A.; HAGIWARA, M.K. Estudo clínico da doença do trato urinário inferior em gatos domésticos de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Researchs. Animal Science***,* v.35, n.2, p.69-74, 1998.

RECHE JUNIOR, A. A orbifloxacina no tratamento das cistites bacterianas em gatos domésticos. **Cienc. Rural**, v. 35, n. 6, p. 1325-1330, 2005.

REDONDO, C.; ALONSO, G. Plásmidos conjugativos aislados de cepas multirresistentes de pacientes de quatro centros de salud del area metropolitana de Caracas. **Rev. Soc. Ven. Microbiol**., v. 27, n. 2, p. 100-107, 2007.

REGUA-MANGIA, A. H.; BEZERRA, R.M.P.; ESPARIS, C.M.; TEIXEIRA, L.M. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC): filotipagem e resistência a antimicrobianos em um enteropatógeno emergente. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, n. 1, p. 27-34, jan.-mar., 2009.

ROBINS-BROWNE, R.M. Traditional enterophatogenic *Escherichia coli* infantile diarrhea. **Rev. Infect. Dis**., v. 9, p. 28-53, 1987.

ROBINS-BROWNE, R.M.; HARTLAND, E.L. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. **J. Gastroenterol. Hepatol***.,* v. 17, p. 467-475, 2002.

ROCHA, S. *Cinoterapia*: a terapia assistida por cães ajuda crianças, adolescentes e idosos a superarem seus limites. Disponível em: <http://www.acessa.com/viver/arquivo/vida_saudavel/2005/06/15-cinoterapia>. Acesso em: 15 out., 2005.

ROSS, S.J.; OSBORNE, C.A.; LULICH, J.P., et al. Canine and feline nephrolithiasis. Epidemiology, detection, and management. **Vet Clin North Am Small Anim Pract** 1999; 29: 231-250.

ROSAS, I.; SALINAS, E.; MARTÍNEZ, L.; CALVA, E.; CRAVIOTO, A.; ESLAVA, C.; AMÁBILE-CUEVAS, C.F. Urban dust faecal pollution in Mexico City: antibiotic resistance and virulence factors of *Escherichia coli*. **Int. J. Hyg. Environ. Health.**, v. 209, p. 461-470, 2006.

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, n. 5, p. 1753-1754, May, 2000.

RYCKE, J.; OSWALD, E.; BOIVIN, R. An *in vivo* assay for the detection of cytotoxic strains of *Escherichia coli*. **Ann. Rech. Vet***.,* v. 20, n. 39-40, 1989.

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.

SANCHEZ, S.; STEVENSON M. A., HUDSON C. R., MAIER M. ; BUNFINGTON T. ; DAM Q. ; MAURER J. J. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infection in dogs. **J. Clin. Microbiol**., v. 40, p. 3586-3595, 2002.

SASAKAWA, C.; BUYSSE, J.M.; WATANABE, H. The large virulence plasmid of Shigella. **Curr. Top. Microbiol. Immunol**., v. 18, p. 21-44, 1992.

SASAKI, H.; SITARAMAN, S.V.; BABBIN, B.A.; GERNER-SMIDT, P.; RIBOT, E.M.; GARRET, N.; ALPER, J.A.; AKYLDIZ, A.; THEISS, A.L.; NUSRAT, A.; KLAPPROTH, J-M.A. Comparison of the function of L- and D-proline as compatible solute in *Escherichia coli* under high osmolarity. **Ann. Microbiol**., v. 57, n. 2, p. 265-268, 2007.

SERPELL, J. A. Childhood pet keeping and humane attitudes in young adulthood. *Animal Welfare*, v. 1, n. 2, p. 321-337, 1993.

SIMJEE, S.; WHITE, D.G.; McDERMOTT, P.F..; WAGNER, D.D.; ZERVOS, M.J.; DONABEDIAN, S.M.; ENGLISH, L.L.; HAYES, J.R.; WALKER, R.D. Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci. **J. Clin. Microbiol**., v.40, p. 4659-4665, 2002.

SIQUEIRA, A.K.; RIBEIRO, M.G.; SALERNO, T.; TAKAHIRA, R.K.; LOPES, M.D.; PRESTES, N.C.; SILVA, A.V. Perfil de sensibilidade e multirresistência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário, de piometra e de fezes de cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., Belo Horizonte, v. 60, n. 5, 2008.

SMITH, H.W.; HALLS, S. Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. **J. Pathol. Bacteriol**., v. 93, n. 2, p. 531-543, April, 1967.

SMITH, K.A.; HAMMERMUELLER, J.; GYLES, C.; WILSON, J.B. A case-control study of verocytotoxigenic *Escherichia coli* infection in cats with diarrhea. **Can. J. Vet. Res**., v. 62, p. 87-92, 1998.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M. GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 4, p. 134- 63, 2007.

SMITH, H.W. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with colicin. *V.* **J Gen Microbiol**., v.83, p.95-111, 1974.

SOUZA, JR. M. A.; FERREIRA, E.S.; CONCEIÇÃO, G.C. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **NewsLab**, edição 63, p. 152-1, 2004.

SOUSA, C.P. The strategies of *Escherichia coli* pathotypes and health surveillance. **Brazilian Journal of Health Surveillance**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 65-70, 2005.

SORESCU, I.; CARAIVAN, I.; POPA, V.; TURCO, D.; TATU-CHITOIU, D.; TONCIU, M.; TAMAS, A.I.; PANCA, C.; STANUICA, D.; VLAD, E. Characterisation of inactive *Escherichia coli* isolates from suckling pigs with diarrhoeic syndrome. **Stud. Res. Vet. Med**. Cucharest, v. 8, p. 63-68, 2000.

STELLA, A.E.; RIGOBELO, E.C.; OLIVEIRA, A.C.; MALUTA, R.P.; MARIN, J.M.; ÁVILA, F.A. Ocorrência e Sensibilidade Microbiana em Cepas de *Escherichia coli*

Enteropatogênicas isoladas de Propriedades Leiteiras na Região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Vet. e Zootec**. v.15, n.1, abril, p.66-74, 2008

SUSSMAN, M. *Escherichia coli in human and animal disease*. The virulence of *Escherichia coli*. Oxford: Academic, 1985. p.7-45.

TANNOCK, G.W. The normal microflora: an introduction. In: TANNOCK, G.W. (ed.). **Medical importance of normal micro-flora**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 1-23.

TALBOT, G.H.; BRADLEY, J.; EDWARDS JR., J.E.; GILBERT, D.; SCHELD, M.; BARTLET, J.G. Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis**. 42**:**657-668, 2006.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 816.

THEA, D.M.; ST LOUIS, M.E.; ATIDO, U.; KANJINGA. K.; KEMBO, B.; MATONDO, M.; TSHIAMALA, T.; KAMENGA, C.; DAVACHI, F.; BROWN, C. A prospective study of diarrhea and HIV-1 infection among 429 Zairian infants. **N. Engl. J. Med**., v. 329, p. 1696-1702, 1993.

TIMMIS, K.N.; MANNING, P.A.; ECHARTI, C. Serum resistance in *E. coli.* In: LEVY, S.B.; CLOWES, R.C.; KOENING, E.L. **Molecular biology, pathogenicity and ecology of bacterial plasmid.** New York: Plenum, 1981. p.133-144.

TOIVANEN, P.; VAAHTOVUO, J.; EEROLA, E. Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora. **Infect. Immun**., v. 69, p. 2372-2377, 2001.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T., A., T.Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infec. Dis**., v. 8, n. 5, p. 508-513, 2002.

TROTT, D.J.; FILIPPICH, L.J.; BENSINK,J.C.; DOWNS, M.T. Canine model for investigating the impact of oral enrofloxacin on commensal coliform and colonization with multidrug-resistant *Escherichia coli*. **J. Medical Microbiol**., v. 53, p. 439-443, 2004.

VAN DEN BOSCH, J.F., EMÖDY, L., KÉTYI, I. Virulence of haemolytic strains of *Escherichia coli* in various animal models. **FEMS Microbiol Lett**, v. 13, p. 427-430, LLF1982.

VAN DEN BOGAARD, A.E.J.M.; STOBBERINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **Int. J. Antimicrb. Agents**, v. 14, p. 327-335, 2000.

VIDOTTO, M.C.; FURLANETO, M.C.; PERUGINI; M.R.E. Virulence factors of *Escherichia coli* in urinary isolates**. Braz J. Med. Biol. Res**., São Paulo, v.24, p.365-373, 1991.

WARREN, A.L.; TOWSEND, K.M. ; KING, T. Multi-drug resistant *Escherichia coli* extended-spectrum B-lactamase activity and fluoroquinolone resistance isolated from clinical infections in dogs. **Aust. Vet. J.**, v. 79, p. 621-623, 2001.

WHO. New frontiers in the development of vaccines against enterotoxinogenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) E. coli infections. **World Health Organization**, Wkly Epidemiol. Rec.1999.

WRIGHT, G.D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews, Microbiology,* v. 5, mar., 2007.
WILES, T.H.; KULESUS, R.R.; MULVEY; M.A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli.* **Experimental and Molecular Pathology**, v. 85, p. 11-19, 2008.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbilogy**, v. 5, March, 2007.

XAVIER, R.J.; PODOLSKY, D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature,** v. 448, n. 7152, p. 427-434, 2007.

YAN, F., POLK, D.B. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. **Curr. Opin. Gastroenterol**., v. 20, p. 565-571, 2004.

YANG, C.C., KONSKY, J. Colicin V treated *Escherichia coli* does not generate membrane potential. **J. Bacteriol***.,* v. 158, p. 757-759, 1984.

YU, H.; LUSCOMBE, N.M.; LU, H.X.; XIA, Y.; HAN, J.D.; BERTIN, N.; CHUNG, S.; VIDAL, M.; GERSTEIN, M. Annotation transfer between genomes: protein–protein interologs and protein–DNA regulogs. **Genome Res**, 14**,**, 1107–1118, 2004.

9 - **APÊNDICE**

Nas páginas seguintes são apresentadas tabelas para a identificação bioquímica de Enterobactérias de importância clínica, segundo Manual de Microbiologia da ANVISA (2004). Estão destacadas as análises para *E. coli* e *E. coli* inativa.

Caracterização Bioquímica das principais Enterobactérias de importância clínica (%)

Bactérias	Gelatina	Malon.	Gás glicose	Lactose	Sacarose	Escul.	DNase
Citrobacter freundii	0	11	89	78	89	0	0
Citrobacter diversus (koseri)	0	95	98	50	40	1	0
Citrobacter amalonaticus	0	1	97	35	9	5	0
Edwardsiella tarda	0	0	100	0	0	0	0
Enterobacter aerogenes	0	95	100	95	100	98	0
Enterobacter cloacae	0	75	100	93	97	30	0
Enterobacter agglomerans	2	65	20	40	75	60	0
Enterobacter gergoviae	0	96	98	55	98	97	0
Enterobacter sakazakii	0	18	98	99	100	100	0
Escherichia coli	0	0	95	95	50	35	0
Escherichia coli inativa	0	0	5	25	15	5	0
Shigella dysenteriae	0	0	0	0	0	0	0
Shigella flexneri	0	0	3	1	1	0	0
Shigella boydii	0	0	0	1	0	0	0
Shigella sonnei	0	0	0	2	1	0	0
Hafnia alvei	0	50	98	5	10	7	0
Klebsiella pneumoniae	0	93	97	98	99	99	0
Klebsiella oxytoca	0	98	97	100	100	100	0
Klebsiella ozaenae	0	3	50	30	20	80	0
Klebsiella rhinoscleromatis	0	95	0	0	75	30	0
Morganella morganii	0	1	90	1	0	0	0
Proteus mirabilis	90	2	96	2	15	0	50
Proteus vulgaris	91	0	85	2	97	50	80
Providencia rettgeri	0	0	10	5	15	35	0
Providencia stuartii	0	0	0	2	50	0	10
Providencia alcalifaciens	0	0	85	0	15	0	0
Salmonella spp.	0	0	96	1	1	5	2
Salmonella typhi	0	0	0	1	0	0	0
Salmonella cholerasuis	0	0	95	0	0	0	0
Salmonella paratyphi A	0	0	99	0	0	0	0
Salmonella gallinarum	0	0	0	0	0	0	10
Salmonella pullorum	0	0	90	0	0	0	0
Salmonella outras	1	v	100	v	1	0 ou 15	1
Serratia marcescens	90	3	55	2	99	95	98
Serratia liquefaciens	90	2	75	10	98	97	85
Serratia rubidae	90	94	30	100	99	94	99
Yersinia enterocolitica	0	0	5	5	95	25	5

Malon. – malonato, Escul. – esculina.

Fonte: www.anvisa.gov.br/servicosaude/.../identificacao5.htm. Acessado em: 5/03/2010

Caracterização Bioquímica das principais Enterobactérias de Importância clínica (%)

Bactérias	Indol	Citr.	H_2S	Uréia	Fenil.	Lisina	Argin.	Ornit.	Motil.
Citrobacter freundii	33	78	78	44	0	0	67	0	89
Citrobacter diversus (koseri)	99	99	0	75	0	0	80	99	95
Citrobacter amalonaticus	100	95	5	85	0	0	85	95	95
Edwardsiella tarda	99	1	100	0	0	100	0	100	98
Enterobacter aerogenes	0	95	0	2	0	98	0	98	97
Enterobacter cloacae	0	100	0	65	0	0	97	96	95
Enterobacter agglomerans	20	50	0	20	20	0	0	0	85
Enterobacter gergoviae	0	99	0	93	0	90	0	100	90
Enterobacter sakazakii	11	99	0	1	50	0	99	91	96
Escherichia coli	98	1	1	1	0	90	17	65	95
Shigella dysenteriae	45	0	0	0	0	0	2	0	0
Shigella flexneri	50	0	0	0	0	0	5	0	0
Shigella boydii	25	0	0	0	0	0	18	2	0
Shigella sonnei	0	0	0	0	0	0	2	98	0
Hafnia alvei	0	10	0	4	0	100	6	98	85
Klebsiella pneumoniae	0	98	0	95	0	98	0	0	0
Klebsiella oxytoca	99	95	0	90	1	99	0	0	0
Klebsiella ozaenae	0	30	0	10	0	40	6	3	0
Klebsiella rhinoscleromatis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Morganella morganii	95	0	20	95	95	v	0	95	v
Proteus mirabilis	2	65	98	98	98	0	0	99	95
Proteus vulgaris	98	15	95	95	99	0	0	0	95
Providencia rettgeri	99	95	0	98	98	0	0	0	94
Providencia stuartii	98	93	0	30	95	0	0	0	85
Providencia alcalifaciens	99	98	0	0	98	0	0	0	96
Salmonella spp.	1	95	95	1	0	98	70	97	95
Salmonella typhi	0	0	97	0	0	98	3	0	97
Salmonella cholerasuis	0	25	50	0	0	95	55	100	95
Salmonella paratyphi A	0	0	10	0	0	0	15	95	95
Salmonella gallinarum	0	0	100	0	0	90	10	1	0
Salmonella pullorum	0	0	90	0	0	100	10	95	0
Salmonella outras	1	90	100	0	0	99	70	99	99
Serratia marcescens	1	98	0	15	0	99	0	99	97
Serratia liquefaciens	1	90	0	3	0	95	0	95	95
Serratia rubidae	0	95	0	2	0	55	0	0	85
Yersinia enterocolitica	50	0	0	75	0	0	0	95	2

Citr. - citrato, Fenil. - fenilalanina, Argin. - arginina, Ornit. - ornitina, Motil. - motilidade

Fonte: *www.anvisa.gov.br/servicosaude/.../identificacao5.htm*. Acessado em: 5/03/2010