

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

FATORES DE VIRULÊNCIA EM LINHAGENS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE INFECÇÃO DE TRATO URINÁRIO,  
PIOMETRA E FEZES DE CÃES

**AMANDA KELLER SIQUEIRA**

BOTUCATU – SP  
Dezembro, 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

FATORES DE VIRULÊNCIA EM LINHAGENS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO, PIOMETRA E FEZES DE CÃES

**AMANDA KELLER SIQUEIRA**

Dissertação apresentada junto  
ao Programa de Pós Graduação  
em Medicina Veterinária para  
obtenção do título de Mestre

**Orientador: Prof. Ass. Dr. Márcio Garcia Ribeiro**

BOTUCATU – SP  
Dezembro, 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

**BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus**

Siqueira, Amanda Keller.

Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário, piometra e fezes de cães / Amanda Keller Siqueira. – 2006.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Assunto CAPES: 50502034

1. Cão - Doenças infecciosas. 2. Aparelho gênito-urinário.
3. *Escherichia coli* – Virulência.

CDD 636.708966

Palavras-chave: Cães: *E.coli*; Fatores de virulência; Infecção do trato urinário; Piometra.

## RESUMO

SIQUEIRA, A. K. **Fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário, piometra e fezes de cães.** 2006, 136p, dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, SP.

*Escherichia coli* é considerado o principal agente causal de infecção de trato urinário (ITU) e piometra em cães. A patogenicidade das linhagens está relacionada a presença de adesinas e diferentes fatores de virulência. Foram avaliadas alterações hematológicas e diferentes fatores de virulência em 51 linhagens de *E. coli* isoladas de ITU, 52 de piometra e 55 de fezes de cães sem sinais entéricos. A produção de  $\alpha$ -hemolisina foi verificada em 26 (51,0%) das estirpes de ITU e em 20 (38,5%) de piometra. Exames hematológicos revelaram principalmente anemia, trombocitopenia e leucocitose por neutrofilia e monocitose nos cães com ITU e piometra. Os maiores índices de sensibilidade nas 158 estirpes foram observados para norfloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacina em mais de 60% dos isolados. Os maiores índices de resistência foram encontrados em 60% ou mais das estirpes com o uso de sulfametoxazole/trimetoprim. Linhagens resistentes a três ou mais antimicrobianos foram constatadas em 24 (47,1%) de ITU, 7 (13,5%) de piometra e 4 (7,3%) das fezes, das quais respectivamente, 17 (33,3%), 1 (1,9%) e 3 (5,5%), com resistência múltipla a cinco ou mais drogas. *fimH* foi observado em mais de 90% dos isolados. *papC* foi detectado em 12 (23,5%) linhagens de ITU, 19 (36,5%) de piometra e 10 (18,2%) das fezes. *papGI* não foi detectado, enquanto *papGII* foi observado em 3 (5,8%) isolados de piometra. *papGIII* foi expressado em 10 (19,6%) linhagens de ITU, 15 (28,8%) de piometra e 9 (16,4%) das fezes. *sfaS* foi encontrado em 22 (43,1%) de ITU, 24 (46,1%) de piometra e 19 (34,5%) das fezes. *afa* foi detectado em 1 (1,9%) linhagem de ITU e de piometra. A citololisina *hlyA* foi expressada em 17 (33,3%) linhagens de ITU, 18 (34,6%) de piometra e 7 (12,7%) das fezes, enquanto *cnf-1* foi detectado em 11

(21,6%) de ITU, 21 (40,4%) de piometra e 9 (16,4%) das fezes. Dentre outros fatores relacionados à virulência, foram observados presença de aerobactina (*iucD*) em 12 (23,5%) isolados de ITU, 9 (17,3%) de piometra e 1 (1,8%) das fezes, enquanto a proteína específica uropatogênica (*usp*) foi detectada em 17 (33,3%) linhagens de ITU e 36 (69,9%) de piometra. Não foram detectados nas 158 linhagens genes codificadores de intimina (*eae*) e verotoxinas (*vt1* e *vt2*) encontrados no sorotipo O157:H7. A principal associação expressada pelas 158 linhagens foi *papC*, *papGIII*, *sfaS*, *hlyA* e *cnf-1*. Depreendeu-se do estudo intensa resposta inflamatória no exame hematológico dos cães com piometra e ITU, similaridade das adesinas entre as linhagens isoladas nos três grupos estudados, alta ocorrência de expressão simultânea de *hlyA*, *cnf-1* e fímbria P, e a elevada multi-resistência das linhagens aos antimicrobianos nos cães com ITU e piometra. Ressalta-se para os reflexos em saúde pública representado pela detecção de linhagens de *E. coli* patogênicas em cães com ITU e piometra, em face do estreito contato do homem com os cães.

**Palavras-chave:** Cães; *E. coli*; Fatores de virulência; Infecção do trato urinário; Piometra.

## ABSTRACT

SIQUEIRA, A. K. **Virulence factors in *Escherichia coli* strains from urinary tract infection, pyometra and feces from dogs.** 2006, 136p, dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, SP.

*Escherichia coli* is considered the more important microorganism in urinary tract infection (UTI) and pyometra in dogs. The pathogenicity of strains is associated with different adhesins and virulence factors. Haematological exams and different virulence factors was evaluated in 51 *E. coli* strains isolated from UTI, 52 from pyometra and 55 from feces of dogs without enteric signs. Alpha-haemolysin was verified in 26 (51.0%) strains from UTI and 20 (38.5%) from pyometra. Haematological exams revealed mainly anaemia, thrombocytopenia and leucocytosis by neutrophilia and monocytosis in dogs with UTI and pyometra. Norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin were the most-effective drugs (>60%) for 158 *E. coli* strains. High rates of *E. coli* resistance to antimicrobials were observed in 60% or more of strains using sulfametoxazole/trimetoprim. Multiple drug resistance for three or more antimicrobials was observed in 2 (47.1%) strains isolated from UTI, 7 (13.5%) from pyometra and 4 (7.3%) from feces. From these, 17 (33.3%), 1 (1.9%) and 3 (5.5%), respectively, showed multiple resistance to five or more drugs. *fimH* was observed in 90% or more of 158 isolates. *papC* was detected in 12 (23.5%) strains isolated from UTI, 19 (36.5%) from pyometra and 10 (18.2%) from feces. None strain expressed *papGI*, while *papGII* was observed in 3 (5.8%) strains of pyometra. *papGIII* was detected in 10(19.6%) strains of UTI, 15 (28.8%) from pyometra and 9 (16.4%) from feces. *sfaS* was observed in 22 (43.1%) strains of UTI, 24 (46.1%) of pyometra and 19 (34.5%) of feces. *afa* was identified in 1 (1.9%) strains isolated from UTI and pyometra. hlyA citolisin was expressed in 17 (33.3%) strains from UTI, 18 (34.6%) from pyometra and 7 (12.7%)

from feces, while *cnf-1* was detected in 11 (21.6%) strains from UTI, 21 (40.4%) from pyometra and 9 (16.4%) from feces. Among other factors related to *E. coli* virulence, aerobactin (*iucD*) was observed in 12 (23.5%) strains from UTI, 9 (17.3%) from pyometra and 1 (1.8%) from feces, while uropathogenic specific protein (*usp*) was detected in 17 (33.3%) strains of UTI and 36 (69.9%) of pyometra. None strains expressed gene encoding for intimin (*eae*) and verotoxin (*vt1* and *vt2*) associated to *E. coli* O157:H7 serotype. The most common combination of virulence genes appears with high frequency in 158 strains isolated from UTI, pyometra and feces were observed to *papC*, *papGIII*, *sfaS*, *hlyA* and *cnf-1*. In summary, high inflammatory response in haematological exams, similarity between adhesins from three groups studied and high occurrence of *hlyA*, *cnf-1* and p fimbriae, and elevated drug resistance expression of strains were observed in dogs with urinary tract infection and pyometra. The results alert for public health reflexes of study represented by pathogenic *E. coli* identification in strains, due to close contact of human and dogs.

**Keywords:** Dogs; *E. coli*; Virulence factors; Urinary tract infection; Pyometra.

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Perfil de sensibilidade microbiana em 158 estirpes de <i>Escherichia coli</i> isoladas de ITU, piometra e das fezes de cães, segundo a porcentagem e os diferentes grupos de estudo. Botucatu, 2006. ....	77
--	----



## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Iniciadores utilizados para detecção de diferentes fatores de virulência em linhagens de *E. coli* isoladas de infecção do trato urinário, piometra e fezes de cães, utilizando a reação em cadeia pela polimerase. Botucatu, 2006. ....69
- Quadro 2. Prevalência de multi-resistência *in vitro* a diferentes antimicrobianos em estirpes de *Escherichia coli*, isoladas de casos de ITU, piometra e fezes de cães. Botucatu, 2006. ....78
- Quadro 3. Frequência de detecção de genes de diferentes adesinas, toxinas e outros fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de ITU, piometra e fezes de cães (controle). Botucatu, 2006. ....80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes para as reações de PCR na detecção de fatores de virulência de <i>E. coli</i> isoladas de cão. Botucatu, 2006. ....	70
Tabela 2. Achados hematológicos em cães com ITU e piometra por <i>Escherichia coli</i> . Botucatu, 2006. ....	74
Tabela 3. Frequência de estirpes de <i>Escherichia coli</i> com presença de hemólise no ágar sangue bovino (5%), isoladas de casos de ITU, piometra e das fezes de cães sem diarreia. Botucatu, 2006. ....	75
Tabela 4. Sensibilidade microbiana em estirpes de <i>Escherichia coli</i> isoladas de ITU, piometra e das fezes de cães. Botucatu, 2006. ....	76
Tabela 5. Associações entre diferentes genes de fatores de virulência investigados em linhagens de <i>E. coli</i> isoladas de ITU em cães. Botucatu, 2006. ....	81
Tabela 6. Associações entre diferentes genes de fatores de virulência investigados em linhagens de <i>E. coli</i> isoladas de piometra em cães. Botucatu, 2006. ....	81
Tabela 7. Associações entre diferentes genes de fatores de virulência investigados em linhagens de <i>E. coli</i> isoladas fezes de cães sem sintomas entéricos. Botucatu, 2006. ....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

® - marca registrada

µg – micrograma

ng – nanograma

µl - microlitro

µm – micrômetro

nm – nanômetro

< - menor que

> - maior que

°C – graus Celsius

A - nucleotídeo adenina

A/E – “attaching e effacing”

*afa* – gene codificador de adesina afimbrial

ALT – alanina aminotransferase

APEC – *Escherichia coli* patogênica para aves

ATP – adenosina trifosfato

BHI – caldo cérebro-coração

bpm – batimentos por minuto

C – nucleotídeo citosina

CEH – hiperplasia cística endometrial

céls – células

cnf – fator necrosante citotóxico

DAEC – *Escherichia coli* de aderência difusa

DEC – *Escherichia coli* diarreiogênica

DNA – ácido desoxirribonucléico

*E. coli* - *Escherichia coli*

eae – *Escherichia coli* “attachment and effacing” / intimina

EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa

EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica

EUA – Estados Unidos da América

ExPEC – *Escherichia coli* extra-intestinal

FA – fosfatase alcalina

Fe – ferro

*fimH* – gene codificador de fímbria H / pili tipo 1

FV – fator de virulência

g – gravidade terrestre (9,81m/s<sup>2</sup>)

G – nucleotídeo guanina

g/dl – gramas por decilitro

*G1, GII, GIII* – variantes de *papG*

H – antígeno flagelar

HeLa – células de linhagem contínua de carcinoma epitelial de cérvix humana

Hep-2 – células de linhagem contínua de carcinoma de laringe humana

*hly* – gene codificador de hemolisina

IE – infecção extra-intestinal

ITU – infecção de trato urinário

*iuc* – gene codificador de aerobactina

K – antígeno capsular

Kda – quilo dálton

LPS – lipopolissacarídeo

LT – termolábil

mg/kg – miligramas por quilo

MgCl<sub>2</sub> – cloreto de magnésio

MIC – concentração inibitória mínima

mM – mili Molar

MNEC – *Escherichia coli* associada com meningite neonatal

NaCl – cloreto de sódio

NCCLS – “National Committee for Laboratory Standards”

O – antígeno somático

OSH – ovariosalpingohisterectomia

PAI – ilha de patogenicidade

*papC* – subunidade C de fímbria P

*papG* – subunidade G de fímbria P

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia pela polimerase

PGF<sub>2</sub> $\alpha$  - prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$

pH – pressão de hidrogênio

qsp – quantidade suficiente para

RNA – ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

*sfa* – gene codificador de fímbria S

SIRS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica

ST – termoestável

STEC – *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga

Stx – toxina de Shiga

SUH – síndrome urêmica hemolítica

T – nucleotídeo timina

TA – temperatura de anelamento

Taq polimerase – polimerase *Thermus aquaticus*

THP – proteína de Tamm-Horsfal

TSA – ágar tríplice de soja

UPEC – *Escherichia coli* uropatogênica

usp – proteína específica uropatogênica

Vero – células de linhagem contínua de rim de macaco verde africano

vt – verotoxina / verocitotoxina

\* Em virtude do uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem sua grafia no inglês.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	27
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	29
2.1 INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO NO HOMEM E ANIMAIS DE COMPANHIA POR <i>E. coli</i> .....	29
2.2 PIOMETRA EM CÃES POR <i>E. coli</i> .....	36
2.3 <i>Escherichia coli</i> .....	40
2.4 <i>E. coli</i> DIARREIOGÊNICAS (DEC) .....	41
2.4.1 <i>E. coli</i> ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) .....	42
2.4.2 <i>E. coli</i> ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC) .....	43
2.4.3 <i>E. coli</i> ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC) .....	44
2.4.4 <i>E. coli</i> ENTEROAGREGATIVA (EAEC) .....	45
2.4.5 <i>E. coli</i> ENTEROINVASORA (EIEC).....	46
2.4.6 <i>E. coli</i> que ADERE DIFUSAMENTE (DAEC) .....	47
2.5 <i>Escherichia coli</i> EXTRA-INTESTINAL (ExPEC – “extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> ”) .....	47
2.5.1 <i>Escherichia coli</i> UROPATOGÊNICA (UPEC – “uropathogenic <i>E. coli</i> ”).....	48
2.6 FATORES DE VIRULÊNCIA (FV) .....	49

2.6.1 ADESINAS .....	51
2.6.1.1 Fímbria tipo1 .....	51
2.6.1.2 Fímbria P (papC/papG) .....	53
2.6.1.3 Fímbria S(sfa) .....	54
2.6.1.4 Família de adesinas Dr .....	54
2.6.2 INTIMINA (eae) .....	55
2.6.3 TOXINAS OU CITOLISINAS .....	56
2.6.3.1 Hemolisina (hly) .....	56
2.6.3.2 Fator Necrosante Citotóxico 1 (CNF-1) .....	57
2.6.3.3 Verotoxinas (vt1 e vt2) .....	58
2.6.4 AEROBACTINA (aer) .....	60
2.6.5 PROTEÍNA ESPECÍFICA UROPATOGÊNICA (usp) .....	61
3 OBJETIVOS .....	64
3.1 Geral .....	64
3.2 Específicos .....	64
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	65
4.1 Delineamento experimental .....	65
4.2 Colheita de material .....	65
4.2.1 Piometra .....	65
4.2.2 Infecção do trato urinário .....	65
4.2.3 Fezes .....	65



4.3 Identificação e manutenção das estirpes de <i>E. coli</i> .....	65
4.4 Exames hematológicos .....	66
4.5 Teste de sensibilidade microbiana (antibiograma) e multi-resistência das I inhagens .....	66
4.6 Detecção de hemolisinas no meio de ágar sangue .....	67
4.7 Reação em Cadeia pela Polimerase .....	67
4.7.1 Controles positivos.....	68
4.7.2 Obtenção de DNA para PCR .....	68
4.7.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) .....	68
4.7.4 Eletroforese em gel de agarose .....	71
4.8 Análise estatística .....	71
4.8.1 Cálculo amostral .....	71
4.8.2 Testes estatísticos .....	71
5 RESULTADOS .....	73
6 DISCUSSÃO.....	84
7 CONCLUSÕES .....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104

## 1 INTRODUÇÃO

As enterobactérias são reconhecidas como um dos grupos bacterianos mais estudados em todo mundo. A família *Enterobacteriaceae* compreende vários patógenos incluindo *Escherichia coli* (*E. coli*), microrganismo complexo e extremamente versátil quanto a diversidade de infecções no homem e em animais (Trabulsi, 2005; Veronesi, 2005).

No que diz respeito as interações entre animais, seres humanos e *Escherichia coli*, podemos dividir esta espécie bacteriana em dois grupos. O primeiro grupo é formado por comensais que habitam o intestino grosso de homeotérmicos de seu nascimento até a morte. O segundo, formado por *E. coli* patogênicas, pode causar diversos tipos de infecções e é constituído por muitos patótipos. Os microrganismos comensais podem causar infecções em indivíduos imunocomprometidos ou de maneira iatrogênica (Trabulsi, 2005; Veronesi, 2005).

As estirpes patogênicas são importantes causas de infecções hospitalares, especialmente de distúrbios entéricos. Ao observarmos as relações entre os animais e o homem, os animais tornam-se importantes reservatórios (Trabulsi, 2005; Veronesi, 2005) e, quando infectados, geram graves perdas econômicas, principalmente quando se trata de animais de produção.

Há vasta diversidade patogênica de *E. coli*. A espécie bacteriana compreende pelo menos seis patótipos associados às infecções intestinais (DEC – “Diarrheagenic *Escherichia coli*”) e vários outros associados com infecções extra-intestinais (ExPEC – “Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*”) (Acha & Szyfres, 2001; Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005; Veronesi, 2005; Greene, 2006).

As manifestações clínicas das colibaciloses estão intimamente associadas com os diferentes fatores de virulência observados nos patótipos. Estes atributos específicos de virulência conferem enorme habilidade de adaptação para a bactéria a novos sítios de infecção (Kaper et al., 2004; Greene, 2006).

As infecções do trato urinário (ITUs) em homens e animais são as infecções extra – intestinais mais comuns causadas por *E. coli*. As estirpes são convencionalmente denominadas uropatogênicas (UPEC – “Uropathogenic *Escherichia coli*”) (Kaper et al, 2004; Greene, 2006). Além disto, *E. coli* também é o microrganismo mais freqüentemente isolado na piometra em cães (Nelson & Feldman, 1986; Nelson & Couto, 2003; Greene, 2006).

Considerando a alta ocorrência de *E. coli* na casuística de infecções do trato urinário e piometra em cães, a severidade dos sintomas clínicos, a diversidade de fatores de virulência nas estirpes associadas às infecções entéricas e extra-intestinais e a possibilidade de transmissão de estirpes patogênicas entre os animais e o homem - notadamente os animais de companhia em virtude do estreito contato com o homem -, o presente estudo procurou avaliar a ocorrência de diferentes adesinas e fatores de virulência de *E. coli* isoladas de ITU, piometra e fezes de cães.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO NO HOMEM E ANIMAIS DE COMPANHIA POR *E. coli*

Define-se como infecção do trato urinário a colonização microbiana de qualquer órgão do sistema urinário. Esta infecção pode ocorrer em apenas um órgão ou em vários do sistema urinário (Cetin et al., 2003; Greene, 2006).

No homem, as infecções de trato urinário nos EUA representam anualmente, cerca de um bilhão de dólares de gastos com saúde pública e mais de seis milhões com consultas médicas (Veronesi, 2005). Estima-se que 50% das mulheres norte-americanas irão apresentar no mínimo uma infecção urinária em sua vida adulta (Stamm & Hooton, 1993; Heilberg et al., 1997; Schor & Srougi, 1998; Anderson, 2003; Veronesi, 2005).

Os primeiros registros de reconhecimento das infecções do trato urinário datam do século IX. Somente em 1881, foi associada a presença de bactérias na urina de paciente com sintomas de infecção do trato urinário. No final do século, Escherich isolou "*Bacillus coli*" da urina de criança com ITU que, posteriormente, foi denominado *Escherichia coli* (Heilberg et al., 1997).

O estreitamento do contato do homem com animais domésticos gera reflexões sobre os riscos de transmissão cruzada de microrganismos patogênicos entre espécies, notadamente pelo consumo de alimentos, fômites ou mesmo pelo contato direto.

*E. coli* é considerado o principal microrganismo na casuística de infecções do trato urinário no homem e animais. As infecções de trato urinário são traduzidas por processos infecciosos de sintomatologia clínica variada envolvendo rins, pelve renal, ureteres, bexiga e/ou uretra, além de estruturas adjacentes como próstata e epidídimo. Alternativamente, grande parcela das infecções do trato urinário podem ser

assintomáticas o que dificulta o diagnóstico (Stamm & Hooton, 1993; Heilberg et al., 1997; Schor & Srougi, 1998; Veronesi, 2005).

Cerca de 70% das infecções são causadas por um único gênero bacteriano. Em pacientes com anomalias anatômicas ou funcionais a associação de agentes torna-se mais comum (Greene, 2006).

As bactérias Gram-negativas mais comumente encontradas são *E. coli*, *Proteus* sp, *Klebsiella* sp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp. *E. coli* é responsável por 37 a 65% das ITUs. Determinadas linhagens de *E. coli* extra-intestinais isoladas de ITUs caninas são indistinguíveis daquelas isoladas de humanos (Bonagura, 2000; Cetin et al., 2003; Nelson & Couto, 2003; Greene, 2006). Microrganismos Gram-positivos correspondem entre 25 a 30% da casuística de infecções do trato urinário (Greene, 2006). Ocasionalmente, outros tipos de microrganismos, como fungos, podem ser isolados de ITU (Barsanti & Finco, 2006).

Assim, as enterobactérias constituem-se no principal grupo de patógenos relacionados às ITU nos animais e no homem.

As relações entre homens e animais têm se tornando cada vez mais estreitas, fazendo com que os animais de estimação sejam considerados potenciais fontes de infecção para as doenças infecciosas.

Nos animais, as infecções bacterianas no trato urogenital estão certamente entre os principais problemas no cotidiano da clínica médica veterinária. Infecções nos tratos urinário e genital podem ocorrer de maneira concomitante ou separadamente. Assim como nos seres humanos, podem se apresentar desde infecções extremamente severas até assintomáticas (Barsanti & Finco, 2006).

Nos cães, estudos assinalam que 14% desenvolvem esta afecção pelo menos uma vez na vida (Cetin et al., 2003). Estima-se que mais de 10% de todos os cães levados aos médicos veterinários apresentam alguma forma de ITU (Bonagura, 2000; Cetin et al., 2003). Assume-se que a ocorrência de ITUs é mais freqüente em fêmeas e animais mais velhos do que em machos e jovens (Cetin et al., 2003).

A maioria das ITUs em cães são causadas pela ascensão das bactérias pela uretra, provenientes da microbiota cutânea, peri-anal e intestinal dos animais ou mesmo da bexiga. A partir da infecção estabelecida na bexiga urinária, os microrganismos podem colonizar uretères e rins (Bonagura, 2000; Nelson & Couto, 2003; Greene, 2006).

O desenvolvimento de infecções do trato urinário invariavelmente se traduz por desequilíbrio entre bactérias da microbiota e hospedeiro (Greene, 2006). Os mecanismos de defesa do hospedeiro, a dose infectante e os fatores de virulência bacterianos são fundamentais para o estabelecimento da infecção (Forrester, 2000; Nelson & Couto, 2003; Greene, 2006).

A presença de microbiota residente, idade e sexo do hospedeiro, as características da urina e a anatomia normal do trato urinário, além da resposta inflamatória local são reconhecidos como mecanismos de defesa contra as infecções (Jarvinen, 1980; Nelson & Couto, 2003; Greene, 2006). A proximidade da genitália das fêmeas com a região anal favorece a infecção do trato urinário das fêmeas por enterobactérias (Greene, 2006).

Além dos fatores predisponentes e imunes intrínsecos do animal susceptível, a presença de fatores de virulência é fundamental para que os microrganismos possam se estabelecer no sistema urinário, especialmente enterobactérias como *E. coli* (Greene, 2006).

A aderência da bactéria ao epitélio do trato urinário previne que o próprio fluxo de urina carregue estes microrganismos para o exterior. Esta colonização ocorre mediante fímbrias - apêndices filamentosos constituídos por proteínas -, presentes na maioria das bactérias Gram-negativas (Nelson & Couto, 2003).

Outros fatores que contribuem para a virulência do microrganismo são antígenos capsulares (K) que interferem com a fagocitose e opsonização bacteriana, e os antígenos somáticos (O) que diminuem a contratilidade da musculatura lisa. Determinadas linhagens bacterianas produzem também hemolisinas que aumentam a

capacidade de penetração e o grau de lesão nos tecidos do hospedeiro (Nelson & Couto, 2003). Algumas estirpes apresentam resistência aos antimicrobianos pela produção de enzimas, mutações e seleção genética ou possuem em seu DNA um fator de resistência denominado Fator R (George, 1996; Nelson & Couto, 2003).

*E. coli* uropatogênicas (UPEC) possuem em seu material genético diversos grupos de genes denominados ilhas de patogenicidade (PAIs). Estas PAIs codificam diversos fatores de virulência (FV) relacionados à patogenicidade do agente nas infecções entéricas e extra-intestinais (Greene, 2006)

Causas iatrogênicas de ITU também são referidas em cães e a mais importante decorre da cateterização das vias urinárias. As bactérias são levadas diretamente para a vesícula urinária durante o procedimento. Como conseqüências, o animal pode apresentar pielonefrite e bacteremia, nos machos podem ocorrer prostatite e epididimite bacterianas secundárias à cateterização (Nelson & Couto, 2003; Greene, 2006).

As ITUs em animais de companhia muitas vezes são assintomáticas (subclínicas) e devido a ausência de sinais clínicos tais infecções são difíceis de serem diagnosticadas. Estes animais podem sofrer severa injúria no aparelho genito-urinário em virtude de agressões de caráter crônico. Estas infecções subclínicas ratificam a importância de exames urinários minuciosos na rotina clínica veterinária, mesmo em animais aparentemente saudáveis (Greene, 2006).

A pielonefrite bacteriana em cães geralmente ocorre associada a outros problemas no trato urinário (Greene, 2006). Nesta espécie caracteriza-se clinicamente por febre, depressão, anorexia e falência renal. Entre os sinais gastrintestinais, destacam-se os episódios de vômito (Nelson & Couto, 2003; Greene, 2006).

A pielonefrite crônica pode ser assintomática ou manifestar-se clinicamente por poliúria e polidipsia (Nelson & Couto, 2003; Greene, 2006). A proximidade entre a uretra e a bexiga, resulta, geralmente, na inflamação concomitante dos dois órgãos (Greene, 2006).

Como sinais clínicos observamos disúria e polaquiúria e a urina apresenta-se hemorrágica, turva e fétida. Grande quantidade de sangue no final da micção sugere ao clínico hemorragia da bexiga. Já a hematúria, no meio da micção, sugere ao veterinário doença uretral ou prostática. Ao exame clínico o veterinário pode constatar dor à palpação abdominal e espessamento da parede da vesícula urinária (Greene, 2006).

Em virtude da presença da microbiota da vagina, prepúcio e uretra distal, o método de colheita é fundamental para o diagnóstico correto. Usualmente pode ser obtido pela cistocentese, sondagem ou micção espontânea (Greene, 2006).

A cistocentese é o método considerado de escolha por evitar contaminação da urina com a microbiota do trato urinário inferior (Nelson & Couto, 2003). Qualquer presença bacteriana indica infecção, porém pode haver contaminação por bactérias da pele. Assim, a cultura deve ser inicialmente quantitativa e, depois, qualitativa, visando a identificação do microrganismo (Greene, 2006).

A vesícula urinária não palpável ou falha na cistocentese permite ao clínico, principalmente nos machos, utilizar sondas para a colheita de urina. Antes da passagem da sonda na uretra do animal, deve ser realizada limpeza e anti-sepsia do prepúcio ou da vulva. A sonda deve ser estéril e manuseada com luvas ou instrumentos esterilizados. Mesmo com os cuidados prévios de antisepsia, devemos lembrar da existência de microbiota no trato urinário inferior. Na passagem da sonda pode haver o carreamento de bactérias patogênicas para a bexiga, levando a infecções urinárias decorrentes do procedimento de sondagem uretral. Estas complicações reduzem a qualidade do material colhido por sondagem comparativamente a cistocentese. Outro método de colheita de urina é representado pela micção espontânea. A colheita de urina durante a micção natural do animal aumenta o risco de contaminação da amostra, não sendo indicada como método adequado para cultura microbiana, somente para urinálise (Greene, 2006).

A colheita da urina por cistocentese é o método mais apropriado de diagnóstico com vistas para cultura e identificação de microrganismos causais nas



ITUs (Barsanti & Finco, 1979; Greene, 2006). Tanto para a urinálise quanto para a urocultura, as amostras de urina devem ser colhidas antes da instituição de tratamento com antimicrobianos. Caso o tratamento já tenha sido iniciado, deve ser descontinuado por no mínimo três dias para a realização do procedimento de cultura (Barsanti & Finco, 1979; Greene, 2006), sendo questionável, pois muitos antimicrobianos deixam resíduos mais duradouros.

Os cuidados com acondicionamento e manuseio da amostra são importantes para prevenir contaminação posterior a colheita e para garantir resultado fidedigno da cultura. Considera-se ideal que a amostra seja imediatamente encaminhada para cultura microbiana após a colheita. Caso não seja possível, a urina deverá ser refrigerada no máximo seis horas. Existem meios de transporte que podem ser utilizados para manter a amostra viável por até 72 horas sob refrigeração (Nelson & Couto, 2003; Greene, 2006).

Na urinálise os achados no sedimento urinário que sugerem ITU são piúria, hematúria e bacteriúria, dos quais este último é o mais específico. Piúria e bacteriúria nem sempre estão associadas a ITU. A ausência de piúria não indica ausência de bacteriúria. Porém, a presença única de piúria demonstra processo inflamatório. Sempre que possível, a cultura deve ser realizada para confirmar a presença ou não do agente infeccioso (Greene, 2006).

A urocultura é apontada como teste diagnóstico definitivo para a confirmação laboratorial de infecção do trato urinário. Diversos gêneros bacterianos e, secundariamente, fungos, podem promover infecções isoladas ou múltiplas no trato urinário de animais de companhia (Greene, 2006).

Dentre os exames clínico-laboratoriais, a presença de leucocitose por neutrofilia, com ou sem desvio à esquerda, é o principal achado nas ITUs em cães. Anormalidades na função renal, como aumento de creatinina, são observados principalmente nos casos de pielonefrite (Greene, 2006).

À semelhança de outras infecções bacterianas em cães, recomenda-se que a terapia seja fundamentada em testes de sensibilidade *in vitro* dos agentes frente aos antimicrobianos de escolha (Nelson & Couto, 2003; Cetin et al., 2003; Greene, 2006). Os dois principais testes utilizados são o método de difusão com discos (Bauer et al., 1966) e a determinação da concentração inibitória mínima-MIC (Quinn & Carter, 1994).

Para o método de difusão são utilizados discos impregnados com concentrações específicas para cada antimicrobiano, de acordo com normas internacionais (NCCLS, 1999). O método de difusão toma como base concentrações séricas atingidas *in vitro* pelos antimicrobianos, o que pode gerar limitações nas concentrações terapêuticas alcançadas *in vivo* em determinados órgãos na terapia (Jarvinem, 1980; Quinn & Carter, 1994).

A concentração inibitória mínima pode ser aferida com fitas impregnadas por diferentes concentrações de antimicrobianos ou utilizando meios de cultura acrescidos de diluições diferentes da droga a ser testada. Este método fornece para o clínico a concentração mínima do medicamento que deverá ser utilizada para inibir a multiplicação bacteriana (Quinn & Carter, 1994). Ambos os testes são padronizados de acordo com as normas do “National Committee for Laboratory Standards” - NCCLS.

A escolha do antimicrobiano deve ser baseada no agente infeccioso, no perfil de sensibilidade *in vitro*, na concentração terapêutica no trato urinário, assim como outros fatores como custo, disponibilidade comercial e vias de administração da droga.

Na ausência de diagnóstico microbiológico o clínico deve realizar a bacterioscopia da urina corada por Gram visando, minimamente, direcionar a escolha do antimicrobiano para bactérias Gram-positivas ou negativas. O pH da urina também pode nortear a escolha do antimicrobiano. Estudos indicam que na presença de urina ácida e bastonetes Gram-negativos, existe maior probabilidade de isolamento de *Escherichia coli*, enquanto na presença de cocos Gram-positivos, existe maior probabilidade de isolamento de *Streptococcus* sp. Já em urinas alcalinas contendo

bastonetes Gram-negativos comumente é isolado *Proteus* sp, e na presença de cocos Gram-positivos, *Staphylococcus* sp (Nelson & Couto, 2003; Greene, 2006).

De forma geral, são recomendados na terapia de ITUs em cães: ampicilina, amoxicilina, amoxicilina com ácido clavulânico, cefalexina, ciprofloxacina, enrofloxacina, gentamicina, tetraciclina e sulfametoxazol com trimetoprim. A terapia deve ser preconizada por no mínimo uma semana, podendo se estender até seis semanas nos casos complicados (Bonagura, 2000; Nelson & Couto, 2003; Cetin et al., 2003).

Adicionalmente, recomenda-se a realização de nova cultura de urina que deverá ser realizada após o término do tratamento para avaliar a eficácia do antimicrobiano utilizado (Bonagura, 2000; Nelson & Couto, 2003).

## **2.2 PIOMETRA EM CÃES POR *E. coli***

A piometra é caracterizada como inflamação do útero com acúmulo de pús intraluminal (Greene, 2006). Esta síndrome afeta cadelas adultas não castradas, causando uma variedade de sinais clínicos sistêmicos (Fransson & Ragle, 2003; Fransson et al., 2003).

Historicamente, a piometra é também denominada hiperplasia endometrial cística, já que as mudanças hormonais uterinas, principalmente na fase luteal provocadas pela progesterona, aumentam a atividade secretória das glândulas do endométrio e diminuem a contratilidade do miométrio, gerando acúmulo de fluidos. Estes fatores, associados com a presença de bactérias no útero, levam a piometra ou complexo hiperplasia cística endometrial (Nelson & Feldman, 1986; Ferreira & Lopes, 2000; Fransson & Ragle, 2003; Nelson & Couto, 2003; Coogan et al., 2004; Romagnoli, 2005; Greene, 2006). Recentemente sugeriu-se a separação deste

complexo em hiperplasia endometrial cística (CEH) e piometra. A CEH pode predispor à piometra. No entanto, a piometra pode cursar sem CEH (Fransson & Ragle, 2003).

A piometra é mais freqüente em cães de meia idade e idosos. A administração de estrógenos pode induzir a doença também em animais jovens (Sandholm et al., 1975; Nelson & Couto, 2003; Fransson & Ragle, 2003; Greene, 2006).

À semelhança das ITUs, *E. coli* é o microrganismo mais comumente associado com a enfermidade, observado como o único agente entre 59 e 96% dos casos. Adicionalmente, é considerado como a principal causa de morbi-mortalidade na piometra em cães (Sandholm et al., 1975; Nelson & Couto, 2003; Fransson & Ragle, 2003; Greene, 2006). *E. coli* infecta o útero, via ascendente, pela cérvix. A predominância do agente está associada com a presença de sítios antigênicos específicos no endométrio - estimulado pela progesterona -, e no miométrio, facilitando a aderência ao tecido uterino (Faldyna et al., 2001; Nelson & Couto, 2003; Greene, 2006).

Linhagens de *E. coli* isoladas do útero de cadelas com piometra têm sido comparadas com estirpes isoladas das fezes dos animais e da vesícula urinária. Estes estudos têm apontado que as linhagens são bioquimicamente e geneticamente semelhantes (Faldyna et al., 2001; Fransson & Ragle, 2003; Greene, 2006), confirmando que a infecção uterina ocorre por bactérias de origem entérica.

Tanto na piometra quanto nas ITUs, as estirpes de *E. coli* possuem fatores de virulência semelhantes, sugerindo também mecanismos similares de patogenicidade entre os microrganismos causadores de ambas infecções (Greene, 2006).

Os gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Salmonella* e *Pseudomonas aeruginosa* são isolados em menor freqüência na piometra em cães (Faldyna et al., 2001; Fransson & Ragle, 2003; Coggan et al., 2004; Bigliardi et al., 2004; Romagnoli et al., 2005; Greene, 2006).

Os casos de piometra ocorrem comumente em torno de dois meses após estro ou acasalamento, ou após administração de estrógenos ou progestágenos (Greene, 2006). A piometra pode ser classificada como aberta ou fechada, de acordo com a presença ou ausência de secreção vulvar. A enfermidade é mais severa em fêmeas que apresentam a cérvix fechada. Em animais com descarga vulvar, a secreção apresenta-se purulenta e usualmente com sangue (Nelson & Feldman, 1986; Kaymaz et al., 1999; Nelson & Couto, 2003; Fransson & Ragle, 2003).

Os principais sinais clínicos relatados são anorexia, vômitos, polidipsia, poliúria e letargia. Os animais afetados também podem apresentar desidratação e febre (Sandholm et al., 1975; Nelson & Feldman, 1986; Kaymaz et al., 1999; Nelson & Couto, 2003; Fransson & Ragle, 2003; Greene, 2006).

O útero das fêmeas com cérvix fechada é mais facilmente palpável. Estes animais podem evoluir para septicemia ou endotoxemia, choque e morte. O conjunto destes sintomas clínicos nos casos graves é denominado “síndrome da resposta inflamatória sistêmica” (SIRS) (Nelson & Feldman, 1986; Fransson, 2003; Fransson & Ragle, 2003; Nelson & Couto, 2003; Greene, 2006).

A SIRS é associada com infecções severas que provocam a liberação de mediadores inflamatórios afetando sistemicamente o animal (Fransson, 2003; Fransson & Ragle, 2003; Greene, 2006). Clinicamente os cães podem apresentar febre, aumento da frequência cardíaca e respiratória. Dentre os achados clínico-laboratoriais na SIRS em cães destacam-se a leucocitose com desvio à esquerda, anemia normocítica normocrômica, assim como alterações hepáticas e renais (Nelson & Couto, 1986; Fransson, 2003; Fransson & Ragle, 2003).

O diagnóstico da piometra é firmado com base na associação dos sinais clínicos e histórico do animal (idade, fase do ciclo estral, acasalamento), aliado a exames clínico-laboratoriais e de diagnóstico por imagem (Nelson & Feldman, 1986; Nelson & Couto, 2003; Greene, 2006).

Diferentes exames subsidiários são utilizados na rotina clínica-diagnóstica e os achados laboratoriais são mais graves em animais com a cérvix fechada (Greene, 2006). A contagem absoluta de leucócitos freqüentemente excede 30.000 células por microlitro. A leucocitose deriva da neutrofilia com desvio à esquerda degenerativo e presença de neutrófilos tóxicos, aliada a anemia normocítica. Concomitantemente há hiperproteinemia (7,5 – 10,0g/dl), decorrente de hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, em consequência da desidratação e estímulo antigênico (Schepper et al., 1987).

As anormalidades bioquímicas podem incluir azotemia, pequeno a médio aumento da alanina amino transferase (ALT) e alterações em fosfatase alcalina (FA) (Nelson & Feldman, 1986; Nelson & Couto, 2003; Fransson et al., 2003; Greene, 2006). Na urinálise os achados incluem piúria, hematúria e proteinúria. A densidade pode apresentar valores acima de 1030 (Nelson & Feldman, 1986; Kaymaz et al., 1999; Nelson & Couto, 2003; Bigliardi et al., 2004; Greene, 2006).

A radiografia e a ultrassonografia são os métodos de diagnóstico por imagem mais comumente utilizados na piometra em cães. A radiografia abdominal permite a visualização do útero e diagnóstico de piometra, caracterizada por estrutura tubular contendo fluido denso, localizada ventral e caudalmente ao abdômen, deslocando as alças intestinais (Prestes et al., 1991). A ultrassonografia é utilizada como método alternativo quando o raio-X é inconclusivo, permitindo determinar o tamanho do útero, a espessura da parede uterina e a presença de fluidos no lúmen do órgão (Kaymaz et al., 1999; Bigliardi, et al. 2004).

O isolamento dos microrganismos da secreção uterina colhidos com “swab” ou mesmo por punção aspirativa, são definitivos no diagnóstico. À semelhança da ITU, a terapia dos animais acometidos deveria ser embasada na identificação dos microrganismos e no teste de sensibilidade aos antimicrobianos (Quinn & Carter, 1994; Ferreira & Lopes, 2000; Fransson et al., 2003; Greene, 2006).

O tratamento deve ser imediato em virtude da agressão do organismo nos animais com piometra. A ovariosalpingohisterectomia (OSH) aliada a terapia

antimicrobiana e a recuperação do equilíbrio hidro-eletrolítico são os procedimentos de escolha no tratamento. O prognóstico do paciente é bom após a cirurgia, com exceção dos casos de ruptura uterina que aumentam em até 50% o risco de morte, conseqüente ao desenvolvimento de peritonite e septicemia (Nelson & Feldman, 1986; Fransson, 2003; Fransson & Ragle, 2003; Nelson & Couto, 2003; Greene, 2006). A terapia com estrógenos, andrógenos e ocitocina não apresenta incremento nos índices de efetividade da terapia (Nelson & Feldman, 1986; Ferreira & Lopes, 2000).

Em animais com cérvix aberta e sem sinais sistêmicos severos, a terapia com prostaglandina (PGF $2\alpha$ ) é uma alternativa. Os efeitos desta droga são a contração do miométrio e relaxamento da cérvix auxiliando na drenagem do conteúdo uterino. Apenas as prostaglandinas naturais devem ser utilizadas, pois as sintéticas são muito potentes e o uso indevido pode levar à morte do animal (Greene. 2006).

### **2.3 *Escherichia coli***

*E. coli* são bacilos Gram-negativos, móveis ou não, anaeróbios facultativos, não esporulados, contendo diferentes fatores de colonização (Quinn & Carter, 1994; Acha & Szyfres, 2001; Trabulsi, 2005).

Estas enterobactérias apresentam membrana citoplasmática, espaço periplásmico, peptidoglicanos ou mureína e membrana externa. Podem apresentar filamento flagelar que se projeta do citoplasma. Possuem cápsula conhecida como antígeno K. A membrana externa é constituída por lipopolissacarídeos (LPS), porinas e fímbrias. O material genético é formado por um único cromossomo circular. Os plasmídeos - material genético extra-cromossomal – contém informações como a produção de toxinas, resistência aos antimicrobianos e podem ser transmitidos entre as linhagens de *E. coli* (Trabulsi, 2005).

Os polissacarídeos de membrana, denominados antígenos O ou somáticos, determinam os mais de 170 sorogrupos de *Escherichia coli*. Os antígenos flagelares ou H são de natureza protéica e distinguem os sorotipos dos diferentes sorogrupos (Acha & Szyfres, 2001).

A patogenicidade e as manifestações clínicas das colibaciloses variam de acordo com a presença de diferentes fatores de virulência das linhagens bacterianas, em especial representados pelas adesinas, toxinas, sistemas de aquisição de ferro e multirresistência (Greene, 2006).

Classicamente *E. coli* é considerado um dos principais agentes causais de enterite no homem e animais. Ocasionalmente o agente é encontrado em ampla variedade de manifestações clínicas extra-intestinais, incluindo afecções dermatológicas, pulmonares, neurológicas, oculares, articulares, gêrito-urinárias, entre outras (Radostitis, 2000; Trabulsi, 2005; Greene, 2006), conotando também seu comportamento oportunista.

#### **2.4 *E. coli* DIARREIOGÊNICAS (DEC)**

As linhagens de *E. coli* relacionadas às manifestações clínicas entéricas ou diarreio-gênicas são divididas na atualidade em seis classes ou grupos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC) (Nataro & Kaper, 1998; Ribeiro, 2001; Acha & Szyfres, 2001; Dantas, 2002; Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005; Veronesi, 2005; Von Sydow, 2005; Greene, 2006).



### **2.4.1 *E. coli* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)**

Foi a primeira categoria de *E. coli* diarreio gênica descrita. Os primeiros estudos datam de 1920 e 1930 na Alemanha, sendo confirmados em 1945 na Inglaterra (Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005; Veronesi, 2005).

Esta classe de *E. coli* é considerada a maior causa de diarreia em crianças com idade inferior a um ano em países em desenvolvimento (Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005; Veronesi, 2005).

Em 1995 foi reconhecida a existência de duas categorias de EPEC, denominadas típica e atípica. Esta última é considerada patógeno emergente tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, incluindo o Brasil. Ambas causam lesão histopatológica no epitélio intestinal denominada lesão A/E (“attaching and effacing”). As principais diferenças são os sorotipos e a presença de plasmídeos específicos. Além disto, as linhagens típicas se aderem de forma localizada. As estirpes atípicas também se caracterizam por aderência localizada, porém frouxa (Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005; Veronesi, 2005).

EPEC se adere às células da mucosa do intestino delgado e cólon causando perda das microvilosidades e formando um pedestal de filamentos de actina (lesão A/E). As mudanças morfológicas nas microvilosidades estão associadas com a resposta inflamatória. Clinicamente observa-se diarreia aquosa com muco e sem sangue, febre e desidratação (Trabulsi, 2005; Veronesi, 2005; Greene, 2006).

Segundo Trabulsi (2005), o homem é reconhecido como único reservatório das EPEC típicas. Raramente são encontradas em animais. As prováveis fontes de infecção são portadores sadios ou doentes. As vias de transmissão incluem contato pessoal e ingestão de água e alimentos contaminados.

#### **2.4.2 *E. coli* ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC)**

Descrita em 1983 com infecção intestinal, esta categoria de DEC foi reportada nos EUA em surtos de diarreia humana ocorridos após ingestão de hambúrgueres (Trabulsi, 2005).

As EHEC são relatadas predominantemente em surtos ou em casos isolados em países desenvolvidos, tendo baixa frequência de isolamento em países em desenvolvimento (Veronesi, 2005; Trabulsi, 2005). A grande maioria dos surtos estão relacionados ao sorotipo O157:H7 (Acha & Szyfres, 2001; Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005).

Esta categoria é caracterizada por diarreia sanguinolenta, trombocitopenia e síndrome urêmica hemolítica (SUH) no homem. A causa da colite e da SUH é atribuída a produção da toxina de Shiga (“Shiga toxin producing *E. coli*”) ou STEC pelo sorotipo O157:H7. A toxina é também denominada verocitotoxina (vt) (Acha & Szyfres, 2001; Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005; Veronesi, 2005; Greene, 2006).

A absorção da toxina Shiga provoca hemorragias intestinais e lesão renal por inibição da síntese protéica. Os casos de infecção humana por *E. coli* O157:H7, principalmente em crianças, evoluem para falência renal e geralmente têm prognóstico desfavorável, mesmo com a instituição do tratamento (Veronesi, 2005; Trabulsi, 2005).

Assim como as EPEC, EHEC também causa lesão A/E (Trabulsi, 2005; Veronesi, 2005; Greene, 2006), porém colonizam somente o cólon (Veronesi, 2005).

As EHEC podem ser encontradas nas fezes da maioria dos animais domésticos, mas o reservatório mais importante para o homem é o bovino (Acha & Szyfres, 2001; Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005; Greene, 2006). A principal via de transmissão é a ingestão de carnes mal passadas. Atualmente têm crescido os casos relacionados ao consumo de água, alface, frutas, sucos fermentados e leite (Acha & Szyfres, 2001; Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005).

No Brasil, Cerqueira et al. (1999) identificaram o sorotipo O157:H7 nas fezes de bovinos de abatedouros. Ribeiro et al. (2006) não identificaram o sorotipo O157:H7 em 120 linhagens de *E. coli* isoladas de mastite, embora tenham identificado estirpes produtoras de verotoxinas.

Há relato de isolamento do sorotipo O157:H7 a partir de fezes de cães provenientes de fazendas, porém sem sinais clínicos de doença por EHEC. Greene (2006) refere o sorotipo O157:H7 nas fezes de cães que freqüentam praias ou que se alimentam de comida caseira, porém sem qualquer sintomatologia clínica.

#### **2.4.3 *E. coli* ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC)**

As ETEC produzem dois tipos principais de enterotoxinas denominadas toxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST) (Acha & Szyfres, 2001; Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005; Veronesi, 2005; Greene, 2006).

A toxina LT possui grande peso molecular e está relacionada imunologicamente com a toxina da cólera. A toxina ST possui baixo peso molecular, perdendo a capacidade antigênica. Ambas são encontradas no DNA plasmidial, podendo ser transferidas entre linhagens de ETEC (Acha & Szyfres, 2001; Veronesi, 2005).

Ao aderirem às células da mucosa do intestino delgado com o auxílio de fímbrias de colonização, as bactérias liberam as toxinas. A LT altera a atividade da adenil ciclase ativando canais de cloro, com conseqüente saída de água e diarreia. A toxina ST estimula a secreção de cloro e inibe a reabsorção de NaCl, aumentando o afluxo de fluídos intestinais (Kaper et al., 2004; Veronesi, 2005; Trabulsi, 2005; Greene, 2006). A ação das duas toxinas resulta na incapacidade do enterócito em reter eletrólitos e líquidos celulares provocando diarreia profusa e aquosa (Trabulsi, 2005).

Segundo Acha & Szyfres (2001) e Trabulsi (2005) as ETEC constituem um dos mais importantes enteropatógenos para o homem. São responsáveis por aproximadamente 20% dos casos de diarreia em crianças com menos de cinco anos em países desenvolvidos. Também é o principal agente da “diarreia dos viajantes” em adultos.

O principal reservatório é o homem e as vias de transmissão são as fezes de doentes e portadores. A infecção ocorre pela ingestão de água e alimentos contaminados (Acha & Szyfres, 2001; Trabulsi, 2005). Existem evidências de transmissão por contato pessoal, em berçários e enfermarias de pediatria. Pacientes acometidos pelo vírus da aids também são alvos destas bactérias (Trabulsi, 2005).

#### **2.4.4 *E. coli* ENTEROAGREGATIVA (EAEC)**

A principal característica das *E. coli* enteroagregativas é seu padrão de adesão às células epiteliais que consiste em um agregado celular que lembra “tijolos empilhados” (Acha & Szyfres, 2001; Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005; Veronesi, 2005). Tal padrão é denominado agregativo e foi estabelecido em 1987 por pesquisadores chilenos, em estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia infantil no país (Trabulsi, 2005).

Esta categoria de *E. coli* diarreiogênica tem sido associada à doença diarreica aguda ou persistente em casos esporádicos, e em surtos de diarreia em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, sendo considerado patógeno emergente (Kaper et al., 2004; Veronesi, 2005; Trabulsi, 2005). Outros estudos relatam a presença significativa de portadores assintomáticos (Veronesi, 2005).

Os mecanismos de patogenicidade das EAEC ainda permanecem em estudo, mas vários fatores de virulência foram descritos (Kaper et al., 2004; Veronesi, 2005; Trabulsi, 2005). Esta classe de *E. coli* possui a toxina termoestável de EAC (EAST-1) e a “plasmid-encoded toxin” (PET). A EAST-1 se correlaciona com ST de ETEC, alterando a corrente iônica das células intestinais. PET induz rompimento do

esqueleto da membrana celular (Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005). Sugere-se que a associação destes fatores culmina com a diarreia. Foram descritas duas proteínas extracelulares denominadas PIC (“protein involved in intestinal colonization”) e dispersina. PIC é uma mucinase que confere à bactéria, *in vitro*, resistência ao soro e a hemaglutinação. A dispersina é imunogênica e auxilia na dispersão da EAEC pela mucosa intestinal (Trabulsi, 2005).

A doença típica é caracterizada por diarreia secretória, mucóide e aquosa, com período de incubação curto, pouca febre e vômitos esporádicos. A classe EAEC foi associada com diarreia persistente em diversos países, inclusive o Brasil, com duração igual ou superior a 14 dias. Diarreia do viajante também é associada com esta categoria de DEC (Trabulsi, 2005).

Estirpes de EAEC já foram isoladas de animais (cavalos, cães, macacos, bovinos e suínos), mas o papel destes como reservatórios para o homem ainda não foi estabelecido (Trabulsi, 2005). Diversos estudos em vários países apontam que os alimentos contaminados podem ser veículos de transmissão (Trabulsi, 2005).

#### **2.4.5 *E. coli* ENTEROINVASORA (EIEC)**

A enfermidade diarreica provocada por *E. coli* enteroinvasora é semelhante à infecção causada pelo gênero *Shigella*. Possui a capacidade de invadir e multiplicar-se nas células do cólon intestinal do homem (Acha & Szyfres, 2001; Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005; Veronesi, 2005).

A diarreia causada por esta categoria é aquosa, seguida por muco e sangue. O paciente também apresenta febre, mal estar e cólicas abdominais (Acha & Szyfres, 2001; Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005).

A capacidade de invasão de células epiteliais e conseqüente infecção de células adjacentes por estas bactérias é regulada tanto por genes plasmidiais quanto por genes cromossomais (Trabulsi, 2005; Veronesi, 2005).

As infecções causadas por EIEC são mais frequentes em crianças maiores que dois anos de idade e em adultos (Veronesi, 2005; Trabulsi, 2005). A transmissão é via fecal-oral e ocorre pela ingestão de água e alimentos contaminados. O reservatório desta categoria de DEC é o homem (Trabulsi, 2005). Possui importância indefinida nos animais.

#### **2.4.6 *E. coli* que ADERE DIFUSAMENTE (DAEC)**

As *E. coli* de aderência difusa são caracterizadas por padrão agregativo que envolve toda a célula (Kaper et al., 2004; Veronesi, 2005). Estudos demonstram DAEC como causa de diarreia em crianças maiores de um ano (Kaper et al., 2004; Veronesi, 2005).

Kaper et al. (2004) afirmam que, aproximadamente, 78% das linhagens de DAEC produzem uma adesina fimbrial denominada F1845 responsável pela ação citopática da bactéria. Esta ação se caracteriza pelo alongamento das microvilosidades ao redor da célula bacteriana, reduzindo a borda em escova da mucosa intestinal.

Trabulsi (2005) não aponta a classe DAEC entre as categorias de DEC justificando que o processo de aderência difusa não define uma categoria, e é encontrado em estirpes associadas com ITUs e infecções intestinais.

### **2.5 *Escherichia coli* EXTRA-INTESTINAL**

#### **(ExPEC – “extraintestinal pathogenic *E. coli*”)**

As infecções extra-intestinais (IEs) por *E. coli* ocorrem em todos os grupos etários e podem acometer diversos órgãos. Como IEs típicas são citadas infecções do

trato urinários (UTIs), meningite (em neonatos e em complicações neurocirúrgicas), infecções intra-abdominais, pneumonia (particularmente em pacientes hospitalizados), infecções intravasculares, osteomielite e infecções em tecidos moles (Russo & Johnson, 2000; Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005; Greene, 2006).

As linhagens de *E. coli* ExPEC são filogeneticamente e epidemiologicamente distintas das comensais e patogênicas do intestino. Aparentemente as ExPEC são incapazes de causar doença entérica, colonizando o trato intestinal de forma estável em animais e humanos saudáveis, a não ser que se estabeleça em sítios extra-intestinais (Russo & Johnson, 2000).

Russo & Johnson (2000) propuseram a utilização do acrônimo ExPEC (“extraintestinal pathogenic *E. coli*”) como nova forma de denominação para as estirpes de *Escherichia coli* não diarreiogênicas. Dependendo do sistema ou órgão acometidos, estas linhagens podem ser denominadas UPEC (“uropathogenic *E. coli*”), MNEC (meningitis – associated *E. coli*) e ainda APEC (“avian pathogenic *E. coli*”) (Russo & Johnson, 2000; Kaper et al., 2004).

### **2.5.1 *Escherichia coli* UROPATOGÊNICA (UPEC – “uropathogenic *E. coli*”)**

As infecções do trato urinário (ITUs) estão entre as infecções mais freqüentes no homem e em animais de todo mundo (Trabulsi, 2005; Sousa, 2006). Nos EUA, os custos anuais diretos ou indiretos com infecções urinárias são superiores a 1,6 bilhões de dólares (Marss et al., 2005). *E. coli* é o principal agente etiológico de cães com infecção urinária, em casos recorrentes de ITU e em cães que apresentem urolitíase (Greene, 2006).

A ocorrência de ITU por *E. coli* em cães é proporcionalmente tão alta como no homem. Em ambos, os patógenos urinários derivam tipicamente de clones específicos, contendo fatores de virulência associados filogeneticamente com o grupo

B<sub>2</sub>. Estas bactérias têm como reservatório o intestino e região peri-anal, e ingressam pelo sistema urinário via ascendente, pela uretra (Greene, 2006).

As UPEC pertencem a um pequeno número de sorogrupos, ao redor de seis, os quais possuem fenótipos epidemiologicamente associados com cistites e pielonefrites. Os principais fatores de virulência expresados por estas estirpes são adesinas, toxinas, proteínas fixadoras de ferro e os antígenos O e K (Kaper et al., 2004; Trabulsi, 2005; Greene, 2006).

O advento da tecnologia molecular tem facilitado os estudos sobre *E. coli* uropatogênica. O rápido acesso aos determinantes virulentos pela PCR (“polimerase chain reaction” / reação em cadeia pela polimerase) tem permitido avanços na epidemiologia, diagnóstico e estratégias de controle. O reconhecimento das características de virulência do microrganismo favorece a interpretação clínica, possibilitando melhor prognóstico dos pacientes decorrentes de ações terapêuticas diferenciadas (Usein et al., 2001).

Linhagens de *E. coli* isoladas de cães e gatos com ITU são similares fenotipicamente e geneticamente com aquelas isoladas de pacientes humanos. Estes achados sugerem que poderia existir infecção cruzada com estirpes patogênicas entre os animais de companhia e seus proprietários (Kurazono et al., 2003).

## **2.6 FATORES DE VIRULÊNCIA (FV)**

A patogenicidade das linhagens de *E. coli* está diretamente ligada a diferentes fatores de virulência, incluindo adesinas, toxinas, mecanismos de captação de ferro, multi-resistência aos antimicrobianos, entre outros (Sousa, 2006).

Tanto nas infecções entéricas quanto no trato urinário faz-se necessária a adesão entre o patógeno e o epitélio do hospedeiro, mediante a interação de adesinas



da bactéria com receptores no tecido. Este contato desencadeia alterações moleculares que iniciam o processo infeccioso (Kau et al., 2005; Sousa, 2006).

As principais barreiras contra as infecções no organismo são representadas pelos mecanismos inatos de defesa, ou inespecíficos, que incluem o fluxo urinário, esfoliação de células epiteliais, secreção da proteína Tamm-Horsfal e quemocinas (interleucina 8), resultando na quimiotaxia de neutrófilos (Oelschlaeger et al., 2002).

A proteína Tamm-Horsfal (THP—"Tamm-Horsfal Protein") é também denominada proteína uromucóide, responsável por interferência na colonização bacteriana. Esta proteína é composta por 25 a 30% de resíduos de carboidratos, os quais são constituintes de receptores análogos para algumas adesinas de *E. coli*. Estas observações sugerem que ao se ligar com a THP, a bactéria não consegue aderir ao uroepitélio, facilitando sua eliminação pelo fluxo urinário (Garcia & Lê Bouguéneq, 1996).

Em casos simples de ITU estes mecanismos são suficientes para conter a infecção em apenas alguns dias. Todos estes microrganismos dispõem de uma variedade de fatores de virulência que os capacitam para causarem infecção no trato urinário. Desta forma, o grupo das *E. coli* uropatogênicas são isoladas de infecções simples, e também responsáveis por infecções em pacientes cateterizados, com formação de cálculos ou com comprometimento do sistema imune (Oelschlaeger et al., 2002).

Os fatores de virulência se encontram inseridos no cromossomo de UPEC e em sua grande maioria em regiões instáveis (regiões móveis de DNA) denominadas ilhas de patogenicidade (PAIs—"Pathogenicity Islands"). Estas PAIs se localizam próximas ou inseridas aos genes do RNA transportador (Nakano et al., 2001; Emody et al., 2003). A transferência horizontal de PAIs é um importante mecanismo de transporte de fatores de virulência de UPEC (Emody et al., 2003).

A regulação da expressão gênica também é aspecto importante na manifestação da virulência das enterobactérias. Condições ambientais como

temperatura, oferta de nutrientes e ferro são fundamentais para o desenvolvimento fenotípico dos sinais clínicos relacionados aos fatores de virulência (Emody et al., 2003).

### **2.6.1 ADESINAS**

As enterobactérias carregam em sua superfície monômeros, oligômeros simples ou componentes de fibras supramoleculares denominadas adesina, pili ou fímbria. As organelas de aderência mais comumente associadas com UPEC são fímbria H, P e S e a família Dr de adesinas (Mulvey, 2002).

Linhagens de *E. coli* produzem adesinas fimbriais que são estruturas presentes no envelope celular, facilmente identificadas por microscopia eletrônica. *E. coli* carrega em torno de 500 fímbrias em sua superfície, sendo cada uma destas estruturas constituídas por aproximadamente 1000 subunidades protéicas (Hacker, 1992).

Fímbrias e flagelos são morfologicamente e funcionalmente distintos. Os flagelos são longos e flexíveis, sendo responsáveis por motilidade e não por aderência. Diferem também de pili sexual, o qual possui função de conjugação e não de ligação com outras superfícies (Johnson, 1991).

Os receptores para adesinas são produzidos por células epiteliais, eritrócitos e pelo glicocálix urinário. Especificamente estas adesinas podem ligar-se com componentes da matriz extracelular como fibronectina, laminina ou colágeno (Garcia & Lê Bouguéneq, 1996).

#### **2.6.1.1 Fímbria tipo1**

Fímbria tipo 1 ou pili tipo1 é a adesina codificada por UPEC mais prevalente. Aproximadamente 80% das linhagens codificam esta fímbria (Hacker,

1992; Mulvey, 2002). Estruturalmente apresenta-se como bastonete helicoidal espesso, com 7 $\eta$ m de diâmetro e comprimento entre 0,5 e 2 $\mu$ m (Johnson, 1991; Mulvey, 2002), constituído por proteínas de subunidade principal fimA e três proteínas de subunidades menores fimF, fimG e fimH (Mulvey, 2002; Tiba, 2004).

Adesinas fimbriais mostram especificidade diferente quanto aos seus receptores presentes em eritrócitos de diversas espécies. Bactérias com a expressão da fímbria do tipo 1 se aderem a diferentes células, incluindo do epitélio bucal humano, intestinais, vaginais, do epitélio uretral e de vasos sanguíneos (Johnson, 1991). Pili do tipo1 reconhece como receptor celular a manose presente em uma glicoproteína secretada pelo epitélio da bexiga denominada uroplaquina, recebendo a denominação de adesina fimbrial sensível a manose (Hacker, 1992; Oelschlaeger et al., 2002; Trabulsi, 2005; Kau et al., 2005).

Pili tipo1 também é considerada invasiva, pois sua ligação com a uroplaquina provoca a endocitose de UPEC. Depois da internalização, a bactéria se prolifera no vacúolo endocítico, aderindo e invadindo o epitélio do trato urinário. Este mecanismo pode ser considerado de evasão da bactéria visto que UPEC não será eliminada pelo fluxo urinário. A própria endocitose também protege o microrganismo da ação de imunoglobulinas e antimicrobianos (Trabulsi, 2005).

A subunidade menor protéica denominada *fimH* é responsável pela invasão bacteriana no tecido do hospedeiro, atuando propriamente como adesina. *fimA* sem a expressão da subunidade *fimH* não possui capacidade de aderência (Johnson, 1991; Oelschlaeger et al., 2002; Mulvey, 2002; Tiba, 2004).

Estudos recentes demonstraram que determinadas variantes de fimH podem mediar contato inter-bacteriano, estimulando auto-agregação das bactérias e formação de biofilme. Estas propriedades conferem maior resistência bacteriana às defesas do hospedeiro e também contra a ação de determinados antimicrobianos. A formação de biofilme, mediada por fímbria do tipo1, também confere a UPEC a capacidade de colonizar catéteres urinários e outros implantes médicos, gerando

infecção em pacientes hospitalizados (Mulvey, 2002; Oelschlaeger et al., 2002; Emody et al., 2003; Kau et al., 2005).

### **2.6.1.2 Fímbria P (papC/papG)**

O receptor de fímbria P é alfa-D-Gal(1-4)alfa-D-Gal (globobiose), um digalactosídeo que se encontra associado a um grupo de ceramidas ancorados na membrana de células epiteliais de pacientes do grupo sanguíneo P (Johnson, 1991; Mulvey, 2002; Oelschlaeger et al., 2002; Trabulsi, 2005). Estes receptores são observados em eritrócitos humanos, de suínos, pombos, caprinos, ovinos, caninos e em células uroepiteliais (Johnson, 1991).

De maneira similar a fímbria do tipo1, a fímbria P é composta por subunidades que constituem uma fibrila pequena e flexível. Grande parte de sua massa é formada pela subunidade papA. Esta fibrila contém uma adesina distalmente localizada, papG, em associação com três outras subunidades, papE, papF e papK (Johnson, 1991; Mulvey, 2002; Tiba, 2004). A subunidade papH atua como âncora para papA na membrana externa bacteriana. A papA é necessária para a formação da fímbria, mas não para a aderência com o receptor “Gal-Gal” (Johnson, 1991). A adesina papG reconhece receptores expressos por eritrócitos e por células presentes no rim de animais e do homem (Mulvey, 2002).

A subunidade papG é dividida em três variantes distintas, GI, GII e GIII (Johnson, 1991; Mulvey, 2002). O alelo *papGI* é associado aos isolados de fezes, enquanto *GII* está relacionado a pielonefrite e *GIII* com cistite (Johnson, 2002; Mulvey, 2002; Tiba, 2004).

Estudos apontam maior associação de fímbria P, especificamente papG, com pielonefrite. Também há a correlação deste fator de virulência com o desenvolvimento de bacteriúria (Mulvey, 2002; Tiba, 2004).

### **2.6.1.3 Fímbria S (sfa)**

Esta fímbria está relacionada a meningites causadas por *Escherichia coli* (Tiba, 2004; Trabulsi, 2005). Também foi encontrada em bactérias isoladas de infecções do trato urinário e sepsis (Mulvey, 2002; Tiba, 2004).

Pili S é composto por uma subunidade maior sfaA associada com três subunidades menores sfaG, sfaH e sfaS. A subunidade sfaS está localizada na extremidade distal da fímbria e permite interações da bactéria com resíduos de ácido siálico expressos por receptores em células do epitélio renal e do endotélio dos vasos (Mulvey, 2002).

Fímbria S facilita a disseminação da bactéria pelos tecidos do hospedeiro (Mulvey, 2002), inclusive causando infecções na bexiga, pois foi verificado resíduo de ácido siálico na uroplaquina<sup>3</sup> (membrana que reveste o lúmen da bexiga) (Mulvey, 2002; Tiba, 2004).

### **2.6.1.4 Família de adesinas Dr**

Este grupo de adesinas inclui adesinas fimbriais Dr e adesinas não fimbriais afal, afall, afalll, afalV, nfal e Drll (Johnson, 1991; Mulvey, 2002), além de O75X. A adesina afimbrial afa é codificada pelo operon *afa* e expressa por UPECs pertencentes a família de hemaglutininas resistentes a manose (Johnson, 1991; Tiba, 2004).

Todas estas adesinas possuem como receptor o antígeno do grupo sanguíneo Dr (Mulvey, 2002; Tiba, 2004). O antígeno denominado DAF (“Decay Accelerating Factor”) é uma glicoproteína regulatória do sistema complemento. A expressão de DAF aumenta durante a gestação, justificando a maior susceptibilidade da mulher gestante para a infecção por UPEC Dr positiva (Mulvey, 2002). Estes receptores são amplamente distribuídos em superfícies epiteliais do trato gastrointestinal, pelve renal, uretra, bexiga e mucosa uterina (Johnson, 1991; Mulvey,

2002; Tiba, 2004). Sugere-se que a família de adesinas Dr facilita a ascensão e colonização bacteriana, e o desenvolvimento de infecção intersticial crônica no trato urinário (Mulvey, 2002).

Contrastando com a fímbria P, as adesinas Dr estão mais freqüentemente associadas com cistites (26 a 50% dos casos) comparativamente às pielonefrites (6 a 26% dos pacientes) (Johnson, 1991). Estudos indicam o aumento no risco de infecções do trato urinário recorrentes naqueles pacientes nos quais as estirpes UPEC apresentaram adesinas da família Dr, pois estes fatores de virulência promovem maior persistência da bactéria no sistema urinário. Recentemente foi descrito que UPEC detentores destas adesinas poderiam manter-se viáveis por mais de um ano no tecido renal (Mulvey, 2002).

### **2.6.2 INTIMINA (*eae*)**

EPECs clássicas são responsáveis por epidemias graves de diarreia aquosa em crianças, principalmente aquelas que não se alimentaram de leite materno (Acha & Szyfres, 2001). Este grupo de *E. coli* diarreiogênica adere-se intimamente às células intestinais formando expansões. O sorotipo O157:H7 também se adere as células formando grupamentos de microcolônias na superfície do enterócito de maneira íntima e localizada, destruindo as microvilosidades, provocando alterações na constituição e no metabolismo celular. Este tipo de lesão foi denominada *Attachment/Effacement* (A/E), pois após sua adesão há também formação de “pedestais ou saliências” nas células (Nataro & Kaper, 1998; Ribeiro, 2001; Dantas, 2002; Moura, 2005; Von Sydow, 2005).

O desenvolvimento da lesão A/E envolve a participação de genes plasmidiais e cromossômicos, bem como resposta celular. Porém, os principais genes envolvidos com A/E se encontram inseridos no cromossomo bacteriano formando uma ilha de patogenicidade denominada LEE (“Locus of enterocyte effacement”). Dentre os genes nesta PAI, encontra-se o gene *eae* (*E. coli* attachment and effacing) que codifica a síntese de uma proteína denominada intimina. Esta intimina é

responsável pela adesão íntima da bactéria com a célula intestinal (Nataro & Kaper, 1998; Ribeiro, 2001; Dantas, 2002; Moura, 2005).

### **2.6.3 TOXINAS OU CITOLISINAS**

Diferentes toxinas com efeito lítico em células epiteliais, eritrócitos e leucócitos são produzidas por *E. coli*, especialmente em linhagens que promovem infecções extra-entericas. Dentre as principais toxinas e citolisinas, assumem destaque para  $\alpha$ -hemolisina (*hlyA*), fator necrosante citotóxico (*cnf*) e verotoxinas (*vt*).

#### **2.6.3.1 Hemolisina (*hly*)**

A  $\alpha$ -hemolisina é uma citotoxina capaz de induzir a formação de poros na membrana de diversas células do hospedeiro, resultando em morte celular (Trabulsi, 2005).

Esta toxina faz parte da família RTX (“Repeat Toxin”). Promove a lise em eritrócitos, leucócitos, células endoteliais e do epitélio renal (Johnson, 1991; Emody et al., 2003), recebendo a denominação de citolisina (Reingold et al., 1999; Tiba, 2004).

A hemolisina é codificada por um operon cromossomal composto de quatro genes designado *hlyABCD*. O gene *hlyA* é estrutural, *hlyC* é responsável pela ativação pós transcricional da proteína estrutural e as proteínas *hlyB* e *hlyC* de membrana, compõem a maquinaria secretória de *hlyA* (Garcia & Le Bouguéneq, 1996; Tiba, 2004). Em animais, o operon *hly* costuma se localizar em plasmídeos (Johnson, 1991; Reingold et al., 1999).

A exposição de polimorfonucleares à  $\alpha$ -hemolisina estimula a degranulação e a liberação de ATP e leucotrienos, causando severas alterações morfológicas, diminuindo quimiotaxia e fagocitose. A lise celular ocorre em altas concentrações da

toxina. Monócitos e granulócitos são altamente sensíveis a citotoxicidade da hemolisina, enquanto linfócitos são relativamente resistentes (Johnson, 1991).

A formação de poros, decorrente da ligação de hly com o receptor na célula do hospedeiro permite o fluxo livre de cátions, íons e água, levando a perda do conteúdo intracelular, alterações no citoesqueleto e no metabolismo da célula (Johnson, 1991; Tiba, 2004).

A produção de hemolisina por *E. coli* uropatogênica em infecções no homem é mais comum em linhagens isoladas de ITU superior, sendo mais freqüente em pacientes com pielonefrite (49%) do que acometidos por cistite (40%) (Johnson, 1991), diminuindo consideravelmente em isolados de bacteremia e das fezes (Johnson, 1991; Tiba, 2004).

### **2.6.3.2 Fator Necrosante Citotóxico 1 (cnf-1)**

Caprioli e colaboradores em 1980 descreveram uma toxina produzida por estirpes de *E. coli* isoladas de enterite de crianças capaz de induzir lesões necróticas em pele de coelho. O efeito citopático desta toxina em linhagens celulares HeLa e Vero leva ao desarranjo do tapete celular, formação de células gigantes e multinucleadas. Em 1983 a toxina foi denominada Fator Necrosante Citotóxico (cnf) (Gyles, 1992; Pohl et al., 1993; Garcia & Le Bouguéneq, 1996; Boquet, 2001).

A toxina cnf-1 induz profunda reorganização no citoesqueleto de actina, multinucleação e alongamento de células HeLa, formação de grandes vacúolos e capacidade de internalização bacteriana em células Hep-2. Estas características sugerem que este fator de virulência pode facilitar a disseminação bacteriana do trato urinário para a corrente circulatória (Garcia & Le Bouguéneq, 1996; Zamora et al., 2000; Boquet, 2001; Tiba, 2004).

A produção de cnf-1 foi reportada em *E. coli* isoladas de casos de enterite, septicemia e nefrite em humanos, diarreia em vacas e suínos, septicemia em touros, e



em casos de septicemia e infecção do trato urinário em cães e gatos (Gyles, 1992; Pohl et al., 1993).

Estudos epidemiológicos revelaram 37% de UPECs produtoras de *cnf-1* e 0,9% de linhagens provenientes das fezes. A produção desta toxina também é freqüentemente associada com a produção de fímbria P e  $\alpha$ -hemolisina (Gyles, 1992; Ribeiro et al., 2002). Hemolisina, fímbria P e *cnf-1* se encontram na mesma PAI na maioria das UPECs, pressupondo que estas toxinas possam atuar em conjunto, favorecendo a patogenicidade da bactéria (Landraud et al., 2000; Boquet, 2001; Tiba, 2004; Tavechio et al., 2004).

### **2.6.3.3 Verotoxinas (VT1 e VT2)**

Konowalchuk e colaboradores descreveram pioneiramente as verotoxinas em 1977, investigando a citotoxicidade do sobrenadante bacteriano filtrado sobre culturas de células Vero (células de rim de macaco verde africano) (Moura, 2005).

A verotoxina tipo 1 (VT1) é funcionalmente e estruturalmente similar à toxina de Shiga (sintetizada por *Shigella dysenteriae*). A VT2 é antigenicamente distinta de VT1, sendo também denominadas toxinas Shiga-like (Stx 1 e 2) (Nataro & Kaper, 1998; Ribeiro, 2001; Dantas, 2002; Moura, 2005; Von Sydow, 2005).

As verotoxinas inibem a síntese protéica das células do hospedeiro. Ainda permanece incerto o papel destas toxinas para os quadros diarréicos (Dantas, 2002). Porém, sabe-se que a diarréia ocorre pela destruição da camada de células de absorção do intestino (Moura, 2005).

As toxinas VT1 e VT2 são constituídas por duas subunidades (A – B). A subunidade B é um pentâmero que se liga a um receptor glicolipídico específico, presente na superfície das células eucarióticas. Após a ligação de B com os enterócitos, a subunidade A é carregada para o interior celular, sofrendo ação de enzimas proteolíticas, reduzida a subfrações. A subfração A<sub>1</sub> remove resíduo de

adenina da porção 28S ribossomal, inibindo a síntese protéica e causando morte celular (Nataro & Kaper, 1998; Ribeiro, 2001; Moura, 2005; Von Sydow, 2005).

Os genes estruturais para as verotoxinas são encontrados em bacteriófagos lisogênicos que os inserem no cromossomo bacteriano (Nataro & Kaper, 1998; Dantas, 2002; Moura, 2005).

Em todo mundo mais de 50 sorotipos de *E. coli* têm sido identificados como produtores de verotoxinas. Entretanto, o sorotipo O157:H7 é o melhor caracterizado e o que desperta maior preocupação no contexto de saúde pública (Nataro & Kaper, 1998; Ribeiro, 2001; Dantas, 2002; Moura, 2005; Von Sydow, 2005).

O impacto das *E. coli* verotoxigênicas como agentes causadores de diarreia em cães ainda não está esclarecido, bem como há pouca informação sobre o sorotipo O157:H7 causando doença na espécie canina. (Von Sydow, 2005). Em cães da raça Greyhound e Dog Alemão há a descrição de uma síndrome, semelhante com a SUH nos homens, denominada Vasculopatia Glomerular Renal e Cutânea (“Alabama Rot”). Esta síndrome, causada pela produção de toxinas por *E. coli*, possui caráter agudo e letal. Lesões cutâneas como crostras e úlceras são observadas em 75% dos animais acometidos e cerca de 25% destes cães podem apresentar falência renal (Nichols et al., 2001; Chantrey et al., 2002; Rotermund et al., 2002; Greene, 2006).

Estas bactérias podem ser isoladas de uma grande variedade de animais. Porém, a espécie mais importante é a bovina, considerada fonte de infecção e reservatório para o homem e outras espécies animais (Nataro & Kaper, 1998; Ribeiro, 2001; Dantas, 2002; Moura, 2005; Von Sydow, 2005).

No Brasil são escassos os estudos conduzidos na investigação de toxinas produzidas por linhagens de *E. coli* isoladas de cães (Dantas, 2002; Von Sydow, 2005).

#### 2.6.4 AEROBACTINA (aer)

O ferro é um dos elementos essenciais para o metabolismo bacteriano. Atua no transporte de elétrons e como catalizador de reações enzimáticas importantes, tais como aquelas envolvidas no metabolismo de hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, além de síntese de DNA (Johnson, 1991; Braun et al., 1999; Faraldo-Gomez et al., 2003). O ferro é um dos elementos químicos mais abundantes nos humores orgânicos. Entretanto, em determinadas condições de disponibilidade de oxigênio e pH neutro torna-se escasso em virtude da rápida oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$ , e da subsequente formação de hidróxidos insolúveis (Johnson, 1991; Braun et al., 1999; Braun et al., 2002; Faraldo-Gomez et al., 2003).

As bactérias possuem vários mecanismos para a captação do íon ferro. Estes se traduzem por receptores de membrana que se ligam especificamente com moléculas carreadoras de ferro, como por exemplo a transferrina ou os haemóforos. Alternativamente, bactérias e fungos sintetizam grande variedade de moléculas de baixo peso molecular capazes de quelar o ferro exógeno chamados sideróforos (Braun et al., 1999; Faraldo-Gomez et al., 2003).

Os sideróforos são representados por três tipos de estruturas: hidroxamatos, catecolatos e  $\alpha$ -hidroxicarboxilatos. Assim como as transferrinas e lactoferrinas, quelam  $\text{Fe}^{3+}$  muito fortemente, transportando o íon para o citoplasma bacteriano através de porinas (Braun et al., 1999; Braun et al., 2002; Faraldo-Gomez et al., 2003).

O sideróforo hidroxamato aerobactina é o mais efetivo sistema de captação de ferro para *E. coli*. Aerobactina é uma molécula pequena formada pela condensação de duas moléculas de lisina e uma de citrato. Linhagens detentoras deste fator de virulência multiplicam-se ou mantêm-se viáveis em baixas condições de ferro, incluindo soro e urina. A produção deste hidroxamato é estimulada por baixas concentrações do íon encontradas nos fluídos corpóreos (Orskov et al., 1988; Johnson, 1991; Garcia & Le Bouguéneq, 1996; Tiba, 2004).

Em todas as linhagens de *E. coli* o sistema de aerobactina é codificado por um operon de cinco genes (*iucABCD* e *iutA*), no qual quatro genes (*iucABCD*) codificam enzimas necessárias para a síntese da aerobactina e um quinto gene (*iutA*), codifica o receptor de membrana externa denominado ferroaerobactina (Johnson, 1991; Garcia & Le Bouguéneq, 1996; Tiba, 2004). Os determinantes genéticos que regulam a síntese de aerobactina podem ser plasmidiais ou cromossomais (Orskov et al., 1988; Garcia & Le Bouguéneq, 1996; Tiba, 2004).

Eventos sucessivos na biossíntese de aerobactina são catalizados pelos genes *iuc* na seqüência DBAC e envolvem: (I) hidroxilação da lisina, (II) acetilação do grupo hidroxil para ácido hidroxâmico e (III) condensação sucessiva de duas moléculas de ácido hidroxâmico para aerobactina (Johnson, 1991; Tiba, 2004).

Aerobactina e fímbria P são comumente encontradas em associação em isolados de pacientes com ITU e urosepsis (Johnson, 1991). Orskov et al. (1988) identificaram, simultaneamente, aerobactina, fímbria P e hemolisina em pacientes com infecção urinária. Plasmídios carreadores de genes de aerobactina freqüentemente possuem genes associados com resistência aos antimicrobianos (Johnson, 1991; Tiba, 2004).

A detecção de aerobactina é freqüente em *E. coli* isoladas de pacientes com pielonefrite (73%), cistite (49%) ou bacteremia (58%), comparativamente a pacientes com bacteriúria assintomática (38%) ou de estirpes fecais (41%), denotando a participação deste fator de virulência para o desenvolvimento de ITU (Orskov et al., 1988; Johnson, 1991; Garcia & Le Bouguéneq, 1996).

### **2.6.5 PROTEÍNA ESPECÍFICA UROPATOGÊNICA (*usp*)**

A toxina zot foi encontrada em sobrenadante de cultura de *Vibrio cholerae*. Tem como função aumentar a permeabilidade de membrana do intestino delgado.

Recentemente descobriu-se que esta toxina induz a reorganização do citoesqueleto de actina por um mecanismo mediado por fosfolipase C e por proteína quinase. Zot foi classificada como uma nova família de enterotoxinas, porém também encontrada em UPECs (Kurazono et al., 2000).

Com o intuito de investigar a prevalência de zot em estirpes de UPEC, Kurazono et al. (2000) descreveram uma nova ilha de patogenicidade responsável pela expressão de proteína associada com *E. coli* uropatogênicas. Esta proteína, formada por 346 aminoácidos, foi designada proteína específica uropatogênica (usp-“uropathogenic specific protein”).

A aderência às células do hospedeiro é um estágio essencial para o desenvolvimento de ITUs, seguida pela expressão de fatores de virulência. Muitos genes de virulência têm sido identificados em UPEC, incluindo fímbria tipo1, P, F e S e família Dr. Destas adesinas, fímbria P mostra alta associação com pielonefrite. A ocorrência de *E. coli* produtoras de usp é significativamente maior do que a presença de fímbria P ou qualquer outro fator de virulência. Este fato também é observado quando linhagens de UPEC são comparadas com estirpes de origem fecal. Dentre os vários fatores de virulência de UPEC, nenhum é tão especificamente associado com todas as manifestações de ITU quanto usp (Kurazono et al., 2000).

A proteína específica uropatogênica aumenta a infectividade da bactéria (Yamamoto et al., 2001). Estudos demonstraram a presença de usp em 80% de pacientes com cistite, 93% com pielonefrite e 24% em linhagens isoladas de fezes de indivíduos saudáveis (Kurazono et al., 2000; Kurazono et al., 2003; Tiba, 2004). Entretanto, são poucos os estudos no Brasil visando a investigação da proteína específica uropatogênica em linhagens de *E. coli* isoladas de animais, especialmente em animais de companhia.

No Brasil são escassos os estudos com o objetivo de avaliar os fatores de virulência de *E. coli* isoladas de cães, assim como sua inter-relação com achados clínico-epidemiológicos e reflexos em saúde pública, em virtude do estreito contato do homem com animais de companhia. O presente estudo pretendeu avaliar os principais

fatores de virulência (adesinas e toxinas) em estirpes de *E. coli* isoladas de infecções do trato urinário, piometra e das fezes de animais sem sintomas entéricos. Adicionalmente foram investigados os principais achados clínico-laboratoriais dos animais, além da realização do teste de sensibilidade microbiana, com intuito de fornecer, respectivamente, subsídios ao clínico de pequenos animais, no tocante ao diagnóstico e terapia das afecções. A caracterização das UPEC visa contribuir no entendimento da epidemiologia e fisiopatogenia das infecções do trato urinário e piometra em cães. A caracterização de fatores de virulência nas estirpes que sejam comuns ao desenvolvimento de doença no homem e em cães, ou que favoreçam a patogenicidade das estirpes, pode alertar para o risco de transmissão destas linhagens para o homem, decorrente do contato estreito com esta espécie animal.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- Avaliar a presença de diferentes fatores de virulência em estirpes de *E. coli* isoladas de infecção do trato urinário, piometra e fezes de cães.

#### 3.2 Específicos

- Analisar a resposta hematológica em cães acometidos por infecção do trato urinário e piometra decorrente de infecção por *E. coli*;
- Estabelecer o perfil de sensibilidade microbiana e a ocorrência de multi-resistência a diferentes antimicrobianos nas linhagens de *E. coli*;
- Verificar a presença do gene codificador de fímbria tipo 1, fímbria P, fímbria S e adesina afimbrial nas estirpes de *E. coli*;
- Avaliar a presença do gene codificador das citotoxinas *cnf1* e *vt* nas estirpes de *E. coli*;
- Verificar a presença de genes de hemolisinas e aerobactina, mecanismos ligados à patogenicidade de *E. coli* por captação do íon ferro;
- Determinar a ocorrência do gene da proteína específica uropatogênica nas linhagens de *E. coli*;
- Comparar a expressão gênica de diferentes adesinas, a produção de toxinas, e a ocorrência de mecanismos de captação de ferro e multi-resistência aos antimicrobianos entre as linhagens de *E. coli* isoladas de infecção do trato urinário, piometra e das fezes;
- Avaliar os reflexos em saúde pública da presença de linhagens de *E. coli* patogênicas isoladas de cães com ITU, piometra e das fezes.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento experimental**

Foram estudados os fatores de virulência em 158 linhagens de *E. coli* isoladas de ITU (51 linhagens), piometra (52 linhagens) e fezes (55 linhagens) de cães.

### **4.2 Colheita de material**

4.2.1 Piometra: As linhagens de *E. coli* isoladas de piometra foram obtidas de material colhido, assepticamente, diretamente do útero de cadelas no centro cirúrgico da disciplina de Reprodução Animal da FMVZ. No local da punção foi realizada anti-sepsia com álcool-iodado (70%/1%) e utilização de agulhas e seringas estéreis.

4.2.2 Infecção do trato urinário: As estirpes de *E. coli* isoladas de infecção do trato urinário foram obtidas através de colheita de urina por cistocentese (Greene, 2006), após devida anti-sepsia local com álcool-iodado (70%/1%) e com o uso de agulhas e seringas estéreis.

4.2.3 Fezes: As linhagens de *E. coli* isoladas de fezes foram obtidas após coleta de material fecal diretamente da ampola retal de animais saudáveis, sem sintomas entéricos, com auxílio de “swabs” estéreis.

### **4.3 Identificação e manutenção das estirpes de *E. coli***

Todo material coletado foi enviado imediatamente ao Serviço de Diagnóstico Microbiológico de Doenças Infecciosas dos Animais do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, sob condições de refrigeração (4-8°C).



O isolamento dos microrganismos provenientes de ITU, piometra e das fezes foi realizado semeando-se o material nos meios de ágar sangue bovino desfibrinado (5%) e ágar Mac Conkey. As placas foram mantidas em condições de aerobiose a 37°C, por três dias, avaliadas a cada 24 horas.

As colônias lactose-positivas no meio de Mac Conkey foram submetidas a testes bioquímicos MILI (motilidade, lisina, indol), EPM (glicose, gás, LTD, H<sub>2</sub>S, réase) e citrato (Trabulsi, 2005). *E. coli* foi caracterizada segundo as características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo (Edwards & Ewing, 1972; Krieg & Holt, 1994; Trabulsi, 2005).

#### **4.4 Exames hematológicos**

Foi realizado o hemograma completo (eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas) em 33 animais com ITU e 26 com piometra, segundo Feldman et al. (2000)(Anexo).

#### **4.5 Teste de sensibilidade microbiana (antibiograma) e multi-resistência das linhagens**

As 158 linhagens de *E. coli* foram submetidas ao teste de sensibilidade microbiana – método de difusão com discos – (Bauer et al., 1966), utilizando-se antimicrobianos indicados para a terapia de ITU e piometra por *E. coli* em animais de companhia e/ou disponíveis comercialmente para uso na rotina veterinária, a saber: ampicilina (10µg), cefalexina (30µg), ceftiofur (30µg), ciprofloxacina (5µg), enrofloxacina (5µg), florfenicol (30µg), gentamicina (10µg), norfloxacina (10µg) e sulfametoxazol com trimetoprim (25µg). A leitura dos antibiogramas foi realizada segundo o “National Commitee for Clinical Laboratory Standards” – NCCLS (NCCLS, 1999).

Foram consideradas multi-resistentes as linhagens que apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos.

As linhagens de *E. coli* isoladas foram estocadas em triplicata, em solução de BHI acrescido de glicerol (5%) e congeladas a – 80°C. Adicionalmente, foram mantidas sob temperatura de refrigeração (4°C) em ágar nutriente. Posteriormente, as estirpes passaram a ser estocadas no meio de Liginíeres, em temperatura ambiente (25°C).

#### **4.6 Detecção de hemolisinas no meio de ágar sangue**

A detecção da produção de hemolisina foi realizada semeando todas as amostras de material no meio de ágar sangue bovino desfibrinado (5%), conforme descrito no item 4.3, mantidas em condições de aerobiose, a 37°C, por três dias. As linhagens que apresentaram halo de hemólise total ao redor das colônias no meio de ágar sangue, com identificação concomitante de *E. coli* no ágar Mac Conkey e caracterizadas bioquimicamente, foram considerados como hemolíticas.

#### **4.7 Reação em Cadeia pela Polimerase**

A PCR foi realizada com intuito de diagnóstico dos seguintes fatores de virulência:

- adesinas: fímbria tipo 1, fímbria P, fímbria S, adesina afimbrial e intimina eae;
- toxinas: hemolisina, fator necrosante citotóxico, verotoxinas;
- sistema de captação de ferro: aerobactina;
- proteína específica uropatogênica.

4.7.1 Controles positivos: Como controle positivo para as adesinas e demais fatores de virulência foram utilizadas as seguintes cepas padrão: FVL2 (*sfa*, *pap*, *iuc*, *hly*, *cnf-1*), FVL16 (*cnf-1*, *hly*, *pap*, *sfa*), FV35 (*afa*, *iuc*, *cnf-1*), FVL8 (*sfa*, *pap*, *papGII*, *hly*, *iuc*, *usp*, *cnf-1*), J96 (*papGI*, *papGIII*), ORN 115 (*fimH*) e O157:H7 (*vt1* e *vt2* e *eae*). Todas as amostras foram cedidas pelo Prof. Dr. Domingos da Silva Leite do Laboratório de Antígenos Bacterianos II, do Departamento de Microbiologia e Imunologia/IB – UNICAMP, Campinas, SP.

4.7.2 Obtenção de DNA para PCR: O método utilizado para obtenção de DNA foi descrito por Blanco et al. (1997). Este método consistiu no cultivo das linhagens em caldo cérebro coração (BHI), a 37°C, “over night”. Em seguida as estirpes foram semeadas em ágar TSA (Tryptic Soy Agar), a 37°C, por 24 horas, para crescimento confluyente. Um raspado de cada uma das linhagens foi suspenso em 100µl de água ultra-pura estéril. Estas suspensões foram fervidas por 10 minutos e centrifugadas a 9676,8g (12.000 rpm) por 3 minutos (centrífuga Sorvall® MC12). Após centrifugação, foram utilizados os sobrenadantes destes materiais para as reações de PCR.

4.7.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR): Para a PCR foram utilizados “primers” específicos para cada um dos genes: *fimH* (adesina da fímbria do tipo 1), *papC* (proteína de membrana externa da fímbria P), *papGI/GII/GIII* (alelos da adesina papG), *sfaD/E* (região conservada *sfa/foc* de fímbria S), *afaB/C* (região conservada chaperona âncora de adesina afimbrial), *hlyA* (proteína estrutural hemolítica), *iucD* (oxigenase responsável pela biossíntese da aerobactina), *usp* (proteína específica uropatogênica), *vt1* e *vt2* (genes codificadores para verotoxinas dos tipos 1 e 2) e *eae* (gene codificador para *eae* - *E. coli* attachment and effacing). O quadro 1 apresenta a seqüência de iniciadores, peso molecular e temperatura de anelamento das reações de cada fator de virulência investigado.

Quadro 1. Iniciadores utilizados para detecção de diferentes fatores de virulência em linhagens de *E. coli* isoladas de infecção do trato urinário, piometra e fezes de cães, utilizando a reação em cadeia pela polimerase. Botucatu, 2006.

GENE	SEQÜÊNCIA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS (5' – 3')	TA* (°C)	PRODUTO AMPLIFICADO (pb)	QUANTIDADE INICIADORES POR REAÇÃO (ng/µg)	REFERÊNCIA
<i>cnf1</i>	CNF1: GAA CTT ATT AAG GAT AGT CNF2: CAT TAT TTA TAA CGC TG	63	533	90	Blanco et al., 1997
<i>hlyA</i>	1: AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T 2: ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A	63	1.177	60	Yamamoto et al., 1995
<i>papC</i>	1: GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G 2: ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A	60	328	60	Daigle et al.; 1994
<i>papG classe I</i>	1: CAA CCT GCT CTC AAT CTT TAC TG 2: CAT GGC TGG TTG TTC CTA AAC AT	63	692	60	Karkkainem et al., 1998
<i>papG classe II</i>	1: GGA ATG TGG TGA TTA CTC AAA GG 2: TCC AGA GAC TGT TCA AGA AGG AC	63	562	60	Karkkainem et al., 1998
<i>PapG classe III</i>	PG1: CAT GGC TGG TTG TTC CTA AAC AT PG2: TCC AGA GAC TGT GCA GAA GGA C	63	421	60	Karkkainem et al., 1998
<i>fimH</i>	A: TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG B: GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA	63	508	60	Johnson & Stell, 2000
<i>afaB/C</i>	1: GCT GGG CAG CAA ACT GAT AAC TCT C 2: CAT CAA GCT GTT TGT TCG TCC GCC G	76	750	60	Yamamoto et al., 1995
<i>sfaD/E</i>	1: CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A 2: CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C	63	410	90	Daigle et al., 1994
<i>iucD</i>	A: TAC CGG ATT GTC ATA TGC AGA CCG T B: AAT ATC TTC CTC CAG TCC GGA GAA G	63	602	60	Yamamoto et al., 1995
<i>usp</i>	A: ATG CTA CTG TTT CCG GGT AGT GTG T B: CAT CAT GTA GTC GGG GCG TAA CAA T	66	1.000	60	Nakano et al., 2001
<i>vt1</i>	A: AAG TTG CAG CTC TCT TTG AAT A B: TGC AAA CAA ATT ATC CCC TGA G	53	364	90	Geniyi et al., 1994
<i>vt2</i>	A: GGG CAG TTA TTT TGC TGT GGA B: GTA TCT GCC TGA AGC GTA A	53	515	90	Geniyi et al., 1994
<i>eae</i>	A: GAC CCG GCA CAA GCA TAA GG B: CCA CCT GCA GCA ACA AGA GC	63	384	30	Yu & Kaper, 1992

\*TA: Temperatura de anelamento

A tabela 1 apresenta os reagentes utilizados na PCR no diagnóstico de fatores de virulência em *E. coli* isoladas de ITU, piometra e fezes de cães.

Tabela 1. Reagentes para as reações de PCR na detecção de fatores de virulência de *E. coli* isoladas de cão. Botucatu, 2006.

REAGENTES	VOLUME (µl)	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água ultra-pura estéril (qsp)	30	-----
10X "PCR Buffer" (Fermentas)	3	1X
10mM "dNTP mixture" (Fermentas)	0,6	0,2mM cada
"primer" 1	*	-----
"primer" 2	*	-----
50mM MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)	1,2	2,0mM
DNA extraído	7	-----
"Taq-DNA Polimerase" (Fermentas)	1	1,0U
TOTAL	30	-----

\*Os iniciadores foram preparados em uma concentração de 30ng/µl. De acordo com a necessidade de iniciadores para as reações de PCR utilizou-se 1, 2 ou 3 vezes da concentração inicial.

As PCRs das soluções foram realizadas em termocicladores (GeneAmp®, PCR System 9700 PE Applied Biosystems) programados para pré-aquecimento a 94°C/10 minutos e 30 ciclos de: 94°C/1 minuto, temperatura de anelamento de acordo com o gene pesquisado, temperatura de extensão 72°C/2 minutos, seguida por 72°C/7 minutos.

4.7.4 Eletroforese em gel de agarose: Após realizadas as ampliações dos DNAs bacterianos, às soluções foi adicionado 5µl de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol e 25% de ficoll). O gel de agarose (Amersham Pharmacia Biotech/Suécia) foi preparado em concentração 2,0% em TAE (tampão Tris 2M, ácido acético 0,04M, EDTA 0,01M pH 8,0). Em cada poço do gel foram dispostos 10µl da mistura.

As “corridas” foram realizadas em cubas de eletroforese Horizon® 11-14 ou 58, Life Technologies™, Gibco BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus, com 100mV por 40 minutos e amperagem variável.

As bandas foram identificadas após incubação em solução de brometo de etídio (1,5µg/ml), por 15 minutos, e visualizadas em transiluminador de luz UV. Os géis foram fotografados e as imagens capturadas pelo sistema Image Master® VDS (Pharmacia Biotech) e programa LISCAP-Capture Application, respectivamente.

## **4.8 Análise estatística**

**4.8.1 Cálculo amostral:** O cálculo amostral foi fundamentado em levantamento da casuística de ITU e piometra por *E. coli*, diagnosticada pelo Serviço de Diagnóstico Microbiológico de Doenças Infecciosas dos Animais da FMVZ – UNESP/Botucatu, SP, entre 1999 e 2004. O estudo acusou 435 animais com ITU e 87 com piometra, nos quais *E. coli* foi isolada em 20% do total de animais. Considerando-se um erro de 5% e limite de confiança de 99%, foi estimada a amostragem mínima estatística, determinando o estudo de 43 cães com ITU e 31 com piometra. Como cães controle – amostras de material fecal – foi aconselhado o uso equivalente da amostragem mínima de piometra, de 31 cães infectados por *E. coli*. Para a análise dos resultados foi utilizado o programa EpiInfo 6.0 (*Centers for Disease Control, Atlanta*), conforme descrito por Kish (1965).

**4.8.2 Testes estatísticos:** Os grupos com infecção do trato urinário, piometra e controle foram comparados entre si, quanto à frequência de caracteres

fenotípicos, bem como quanto à frequência de detecção de genes, utilizando o teste de  $\chi^2$ , contrastando as frequências entre grupos pelo cálculo do intervalo de confiança 95%. A frequência de linhagens resistentes a um ou mais antimicrobianos foi comparada entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis. A associação entre caracteres fenotípicos e a frequência de genes específicos foi realizada pela análise de regressão logística. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o programa EpiInfo 6 (*Centers for Disease Control, Atlanta*), considerando um nível de significância  $\alpha=0,05$  (Triola, 1999).

## 5 RESULTADOS

Os dados de todos os animais utilizados no estudo, resultados dos exames clínico-laboratoriais, detecção de hemolisinas, perfil de sensibilidade microbiana, pesquisa de adesinas e fatores de virulência encontram-se sumariados no anexo B.

Nas tabelas 2, 3, e 4 e no quadro 3 são agrupados, respectivamente, achados clínico-laboratoriais, hemolisina, perfil de sensibilidade das linhagens aos antimicrobianos, adesinas e fatores de virulência.

Os achados dos exames clínico-laboratoriais dos cães com infecção do trato urinário revelaram 17 (51,5%) dos animais com anemia, 11 (33,4%) com trombocitopenia e 11 (33,4%) com leucocitose, dos quais 3 (9,0%) apresentaram leucocitose por neutrofilia e 7(21,2%) leucocitose por neutrofilia e monocitose.

Nas cadelas com piometra observou-se anemia em 18 (69,2%) dos animais, trombocitopenia em 13 (50,0%) e leucocitose em 20 (76,9%), dos quais 5 (19,2%) leucocitose por neutrofilia e 15 (57,7%) leucocitose por neutrofilia e monocitose.

Ao compararmos os achados laboratoriais de hemograma entre os animais com ITU e piometra, não observamos diferença estatística ( $p>0,05$ ). Ao contrário, o leucograma dos animais com ITU e piometra revelam diferença estatisticamente significativa ( $p<0,01$ ) entre estes dois grupos (Tabela 2).



Tabela 2. Achados hematológicos em cães com ITU e piometra por *Escherichia coli*. Botucatu, 2006.

Variáveis	Grupo Frequência (%)		Estatística
	ITU	PIO	
<b>Hemácias</b>			
Abaixo	17 (51,5%)	18 (69,2%)	p = 0,1337
Normal	16 (48,5%)	8 (30,7%)	
<b>Hematócrito</b>			
Abaixo	16 (48,5%)	18 (69,2%)	p = 0,0903
Normal	17 (51,5%)	8 (30,7%)	
<b>Plaquetas</b>			
Abaixo	11 (33,4%)	13 (50,0%)	p = 0,2533
Normal	17 (51,5%)	8 (30,7%)	
Elevado	2 (6,0%)	0 (-)	
<b>Leucócitos***</b>			
Abaixo	6 (18,2%)	0 (-)	p = 0,0001
Normal	16 (48,5%)	3 (11,5%)	
Elevado	11 (33,4%)	20 (76,9%)	
<b>Neutrófilos</b>			
Abaixo	2 (6,0%)	0 (-)	p = 0,0008
Normal	16 (48,5%)	2 (7,7%)	
Elevado	15 (45,4%)	24 (92,3%)	
<b>Linfócitos</b>			
Abaixo	14 (42,4%)	3 (11,5%)	p = 0,0142
Normal	19 (57,6%)	21 (80,7%)	
Elevado	0 (-)	2 (7,7%)	
<b>Monócitos***</b>			
Abaixo	2 (6,0%)	0 (-)	p = 0,0402
Normal	22 (66,7%)	11 (42,3%)	
Elevado	9 (27,3%)	15 (57,5%)	

\*ITU: infecção do trato urinário

PIO: piometra

%; porcentagem

Valores de p menores que 0,05 indicam diferença estatística significativa entre os grupos, considerando  $\alpha=0,05$

A presença de hemólise no meio de ágar sangue bovino (5%) foi observada em 26 (51,0%) das linhagens de *E. coli* isoladas de ITU, 20 (38,5%) de piometra e em nenhuma estirpe isolada de fezes (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência de estirpes de *Escherichia coli* com presença de hemólise no ágar sangue bovino (5%), isoladas de casos de ITU, piometra e das fezes de cães sem diarreia. Botucatu, 2006.

Grupo	Ocorrência de hemólise Frequência (%)		Total
	Sim	Não	
ITU	26 (51,0%)	25 (49,0%)	51
PIO	20 (38,5%)	32 (61,5%)	52
Fezes	0 (-)	55 (100,0%)	55
Total	46 (29,1%)	112 (70,9%)	158

\*ITU: infecção do trato urinário

PIO: piometra

%; porcentagem

Entre as linhagens isoladas de ITU e piometra não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) para a produção de hemolisina no meio de AS. Entretanto, foi observada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e os isolados de ITU e piometra.

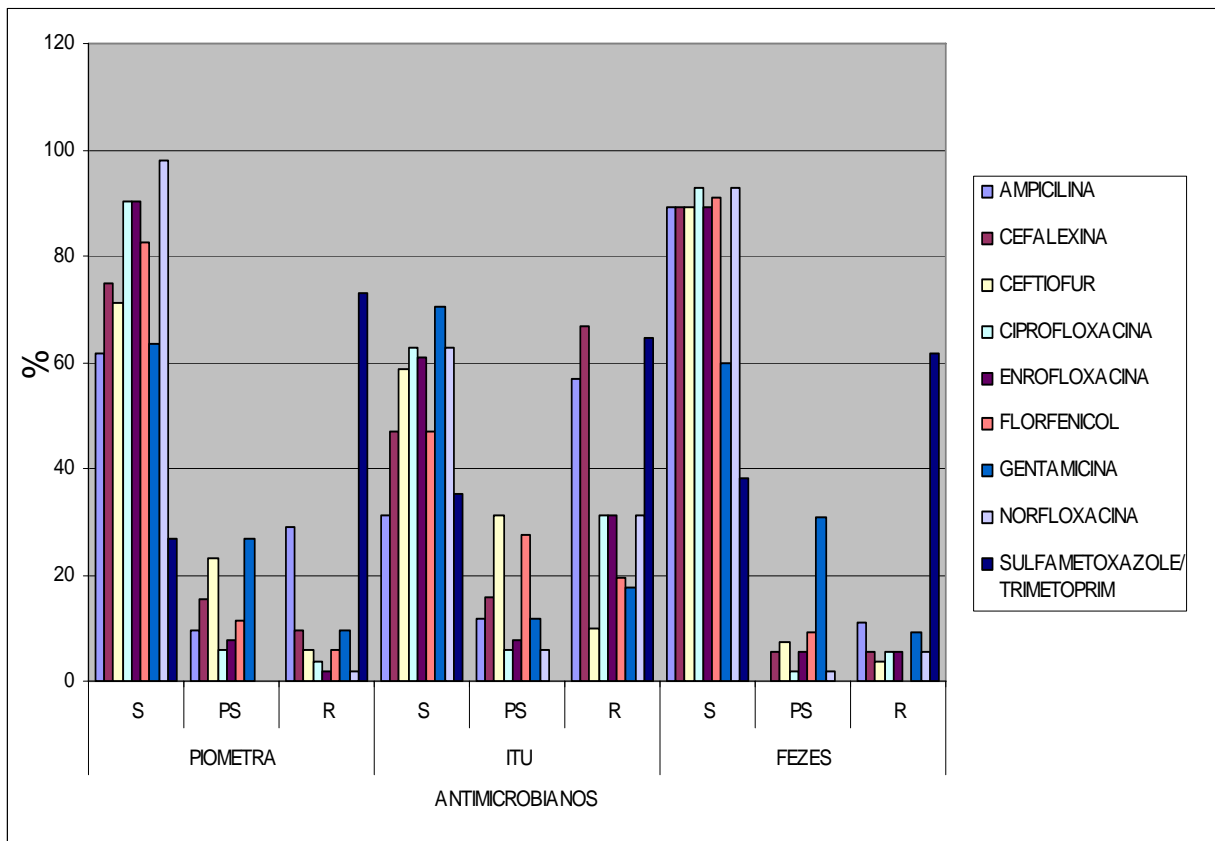
Os maiores índices de sensibilidade das linhagens de *E. coli* isoladas de ITU foram observados para gentamicina (70,6%), ciprofloxacina e norfloxacina, ambas com 62,7% das estirpes sensíveis. Para piometra observou-se maior sensibilidade para norfloxacina (98,1%), ciprofloxacina e enrofloxacina, ambas com 90,4%. Para o grupo controle (fezes) os maiores índices de efetividade foram observados com o uso da ciprofloxacina (92,7%), norfloxacina (92,7%) e florfenicol (90,9%). O maior índice de resistência das linhagens foi observado com o uso de sulfametoxazole com trimetoprim em 64,7% das linhagens de ITU, 73,1% de piometra e 61,8% das fezes (Tabela 4, Gráfico 1).

Tabela 4. Sensibilidade microbiana em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de ITU, piometra e das fezes de cães. Botucatu, 2006.

Antimicrobianos	ITU			piometra			fezes		
	s	ps	r	s	ps	r	s	ps	r
	n° linhagens (%)			n° linhagens (%)			n° linhagens (%)		
Ampicilina	16 (31,7)	6 (11,7)	29 (56,8)	32 (61,5)	5 (9,6)	15 (28,8)	49 (89,1)	0 (-)	6 (10,9)
Cefalexina	24 (47,0)	8 (15,7)	34 (66,7)	39 (75,0)	8 (15,4)	5 (9,6)	49 (89,1)	3 (5,4)	3 (5,4)
Ceftiofur	30 (58,8)	16 (31,4)	5 (9,8)	37 (71,1)	12 (23,1)	3 (5,7)	49 (89,1)	4 (7,2)	2 (3,6)
Ciprofloxacina	32 (62,7)	3 (5,9)	16 (31,4)	47 (90,4)	3 (5,7)	2 (3,8)	51 (92,7)	1 (1,8)	3 (5,4)
Enrofloxacina	31 (60,8)	4 (7,8)	16 (31,4)	47 (90,4)	4 (7,7)	1 (1,9)	49 (89,1)	3 (5,4)	3 (5,4)
Florfenicol	24 (47,0)	14 (27,4)	10 (19,6)	43 (82,7)	6 (11,5)	3 (5,7)	50 (90,9)	5 (9,1)	0 (-)
Gentamicina	36 (70,6)	6 (11,7)	9 (17,6)	33 (63,4)	14 (26,9)	5 (9,6)	33 (60,0)	17 (30,9)	5 (9,1)
Norfloxacina	32 (62,7)	3 (5,9)	16 (31,4)	51 (98,1)	0 (-)	1 (1,9)	51 (92,7)	1 (1,8)	3 (5,4)
Sulfametoxazol/ trimetoprim	18 (35,3)	0 (-)	33 (64,7)	14 (26,9)	0 (-)	38 (73,1)	21 (38,2)	0 (-)	34 (61,8)

\* n°: número  
ITU: infecção do trato urinário  
%: porcentagem  
s: sensível  
ps: parcialmente sensível  
r: resistente

Gráfico 1. Perfil de sensibilidade microbiana em 158 estirpes de *Escherichia coli* isoladas de ITU, piometra e das fezes de cães, segundo a porcentagem e os diferentes grupos de estudo. Botucatu, 2006.



\* %: porcentagem  
 ITU: infecção do trato urinário  
 s: sensível  
 ps: parcialmente sensível  
 r: resistente

A ocorrência de linhagens de *E. coli* resistentes a pelo menos três antimicrobianos foi observada em 24 (47,1%) linhagens isoladas de ITU, 7 (13,5%) de piometra e 4 (7,3%) de fezes (controle). Resistência a cinco ou mais drogas foi constatada em 17 (33,3%) das estirpes isoladas de ITU, 1 (1,9%) de piometra e 3 (5,5%) de fezes (quadro 2).

Quadro 2. Prevalência de multi-resistência *in vitro* a diferentes antimicrobianos em estirpes de *Escherichia coli*, isoladas de casos de ITU, piometra e fezes de cães. Botucatu, 2006.

Grupos	multi-resistência a 3 ou mais* antimicrobianos		multi-resistência a 5 ou mais** antimicrobianos	
	sim	não	sim	não
<b>ITU (n= 51)</b>	24 (47,1%)	27 (52,9%)	17 (33,3%)	34 (66,7%)
<b>PIOMETRA (n= 52)</b>	07 (13,5%)	45 (86,5%)	01 (1,9%)	51 (98,1%)
<b>FEZES (n= 55)</b>	04 (7,3%)	51 (92,7%)	03 (5,5%)	52 (94,5%)

ITU: infecção do trato urinário

%; porcentagem

\* Entre as *E. coli* isoladas de ITU, piometra e controle, houve diferença entre os grupos, com

$\chi^2 = 27,68 (p < 0,0001)$

\*\* Entre as *E. coli* isoladas de ITU, piometra e controle, houve diferença entre os grupos, com

$\chi^2 = 26,54 (p < 0,0001)$

Houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) entre os grupos para multi-resistência a três ou mais, ou a pelo menos cinco ou mais antimicrobianos.

O quadro 3 apresenta a frequência de detecção dos genes para adesinas, toxinas e outros fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de ITU, piometra e fezes em cães.

A presença o gene *fimH* foi observado em mais de 90% da totalidade linhagens de *E. coli*, nos três grupos de estudo. A subunidade fimbrial papC foi observada em 12 (23,5%) das linhagens isoladas de ITU, 19 (36,5%) de piometra e 10 (18,2%) das estirpes do grupo controle. A subunidade papGI não foi observada em nenhuma linhagem, enquanto papGII foi constatada em 3 (5,8%) das linhagens isoladas de piometra e não foi observada nos outros grupos. A subunidade papGIII foi encontrada em 10 (19,6%) das estirpes de ITU, 15 (28,8%) de piometra e em 9 (16,4%) isoladas de fezes de cães sem sintomas entéricos. O gene *sfa* foi observado em 22 (43,1%) linhagens isoladas de ITU, 24 (46,1%) de piometra e 19 (34,5%) de

fezes. A adesina afimbrial (afa) foi encontrada em 1 (1,9%) estirpe de ITU e 1 (1,9%) de piometra, não ocorrendo no grupo controle.

Dentre as toxinas investigadas, hemolisina (*hlyA*) foi observada em 17 (33,3%) das linhagens de ITU, 18 (34,6%) de piometra e em 7 (12,7%) das isoladas das fezes. Não houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre a expressão do gene *hlyA* e a presença de hemólise em agar sangue, entre as estirpes isoladas de piometra e ITU.

O gene para o fator necrosante citotóxico (*cnf-1*) foi detectado em 11 (21,6%) das estirpes de ITU, 21 (40,4%) de piometra e 9 (16,4%) de fezes.

Para os outros fatores de virulência estudados foi constatado aerobactina (*iucD*) em 12 (23,5%) das linhagens isoladas de ITU, 9 (17,3%) de piometra e 1 (1,8%) do grupo controle. A proteína específica uropatogênica (*usp*) foi detectada em 17 (33,3%) das estirpes de ITU e 36 (69,2%) de piometra, não sendo observado em linhagens do grupo controle.

Para a detecção de *E. coli* enterohemorrágicas (relacionadas ao sorotipo O157:H7 foram pesquisados genes codificadores da intimina determinada por *eae* e verotoxinas (*vt1* e *vt2*). Os três grupos utilizados foram negativos para estes fatores de virulência.

Quadro 3. Frequência de detecção de genes de diferentes adesinas, toxinas e outros fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de ITU, piometra e fezes de cães (controle). Botucatu, 2006.

<b>Genes</b>	<b>ITU</b>	<b>piometra</b>	<b>controle</b>
<i>cnf-1</i>	11 (21,6%)	21 (40,4%)	9 (16,4%)
<i>iucD</i>	12 (23,5%)	9 (17,3%)	1 (1,8%)
<i>hlyA</i>	17 (33,3%)	18 (34,6%)	7 (12,7%)
<i>sfaS</i>	22 (43,1%)	24 (46,1%)	19 (34,5%)
<i>papC</i>	12 (23,5%)	19 (36,5%)	10 (18,2%)
<i>papGII</i>	0 (0,0%)	3 (5,8%)	0 (0,0%)
<i>papGIII</i>	10 (19,6%)	15 (28,8%)	9 (16,4%)
<i>usp</i>	17 (33,3%)	36 (69,2%)	0 (-)
<i>afa</i>	1 (1,9%)	1 (1,9%)	0 (-)
<i>vt1</i>	0 (-)	0 (-)	0 (-)
<i>vt2</i>	0 (-)	0 (-)	0 (-)
<i>eae</i>	0 (-)	0 (-)	0 (-)
<i>papGI</i>	0 (-)	0 (-)	0 (-)

\*ITU: infecção do trato urinário

#: porcentagem

Tabela 5. Associações entre diferentes genes de fatores de virulência investigados em linhagens de *E. coli* isoladas de ITU em cães. Botucatu, 2006.

	sa*	cnf	hly	iuc	usp	cnf, usp	cnf, hly	hly, iuc	hly, usp	iuc, usp	cnf, iuc, usp	hly, iuc, usp	cnf, hly, iuc, usp	TOTAL
sa*	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25
papC	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
gIII	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
sfa	0	0	0	0	6	0	0	0	1	0	3	0	1	11
afa	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
papC, gII	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
papC, gIII	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
papC, sfa	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
gIII, sfa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
papC, gIII, sfa	0	0	0	0	0	0	6	0	1	0	0	0	0	7
papC, gII, gIII, sfa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>25</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>51</b>

\*sa: sem associação

ITU: infecção do trato urinário

Tabela 6. Associações entre diferentes genes de fatores de virulência investigados em linhagens de *E. coli* isoladas de piometra em cães. Botucatu, 2006.

	*sa	cnf	hly	iuc	usp	cnf, usp	cnf, hly	hly, iuc	hly, usp	iuc, usp	cnf, iuc, usp	hly, iuc, usp	cnf, hly, iuc, usp	TOTAL
sa*	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22
papC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
gIII	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
sfa	0	0	0	0	3	2	0	0	0	1	4	0	0	10
afa	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
papC, gII	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
papC, gIII	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2
papC, sfa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
gIII, sfa	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
papC, gIII, sfa	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0	4	0	1	9
papC, gII, gIII, sfa	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>22</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>52</b>

\*sa: sem associação

ITU: infecção do trato urinário



Tabela 7. Associações entre diferentes genes de fatores de virulência investigados em linhagens de *E. coli* isoladas fezes de cães sem sintomas entéricos. Botucatu, 2006.

	*sa	<i>cnf</i>	<i>hly</i>	<i>iuc</i>	<i>usp</i>	<i>cnf, usp</i>	<i>cnf, hly</i>	<i>hly, iuc</i>	<i>hly, usp</i>	<i>iuc, usp</i>	<i>cnf, iuc, usp</i>	<i>hly, iuc, usp</i>	<i>cnf, hly, iuc, usp</i>	TOTAL
<b>sa*</b>	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	45
<b><i>papC</i></b>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b><i>gIII</i></b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b><i>sfa</i></b>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<b><i>afa</i></b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b><i>papC, gII</i></b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b><i>papC, gIII</i></b>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<b><i>papC, sfa</i></b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b><i>gIII, sfa</i></b>	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	3
<b><i>papC, gIII, sfa</i></b>	0	1	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	5
<b><i>papC, gII, gIII, sfa</i></b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	45	2	0	1	0	0	7	0	0	0	0	0	0	55

\*sa: sem associação

Das 158 linhagens de *E. coli* estudadas, em 105 (66,4%) foi detectado pelo menos um gene investigado e, em 66 (41,7%) pelo menos dois genes. Em 53 (33,5%) das linhagens não foi constatado nenhum fator de virulência dentre os investigados no estudo (Tabelas 5, 6 e 7; Anexo B).

Dentre todos os genes estudados, foi significativa ( $p < 0,05$ ) a associação entre *cnf-1*, *iucD*, *hlyA*, *papGII* e *usp* nas 158 linhagens de *E. coli* (Tabelas 6, 7 e 8). Entre as linhagens de ITU e piometra, a maior diferença foi observada quanto à detecção do gene *usp* ( $p = 0,002$ ) presente em 33,3% das estirpes de ITU e 69,2% de piometra.

A detecção de *cnf-1*, *hly*, *sfa*, *papGII* e *usp* foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nas linhagens isoladas de ITU ou piometra, comparativamente aos isolados das fezes.

A detecção de *iucD* e *hlyA* foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nas linhagens com hemólise no meio de ágar sangue.

Ocorreu associação significativa ( $p < 0,05$ ) para a presença de *iucD*, *usp* e a multi-resistência a três ou mais antimicrobianos. A multi-resistência a cinco ou mais antimicrobianos também mostrou associação significativa ( $p < 0,05$ ) com a presença dos genes *iucD* e *usp*.

## 6 DISCUSSÃO

As infecções bacterianas do trato urinário e genital dos cães estão entre as afecções mais comumente diagnosticadas na clínica de pequenos animais. Estas infecções podem se apresentar de forma assintomática ou até sob a forma de sinais sistêmicos severos (Greene, 2006). Diversos autores afirmam que *E. coli* é o principal microrganismo envolvido na gênese destas enfermidades.

Dentre os órgãos do sistema urogenital, a vagina, o prepúcio e a uretra distal contém microrganismos residentes que desempenham papel fundamental na defesa do hospedeiro, mantendo o equilíbrio da microbiota local. Entretanto, em determinadas situações também podem causar infecções. Bactérias não são normalmente encontradas em trato urinário superior, bexiga, uretra proximal ou próstata. O útero também é geralmente livre de microrganismos, exceto durante as fases do proestro e estro (Greene, 2006).

O desenvolvimento das infecções urogenitais geralmente indica desequilíbrio entre a microbiota residente e o hospedeiro. Para que a infecção efetivamente ocorra, as bactérias colonizam a mucosa se aderindo ao epitélio. As propriedades de virulência de *E. coli* são fundamentais para a viabilidade do agente no ambiente extra-entérico e para a severidade dos processos urogenitais (Greene, 2006).

O estreito contato entre o homem e animais domésticos gera condições favoráveis para a transmissão de bactérias por contato direto, ou através de contaminação ambiental. As crianças têm maior risco de se infectarem do que os adultos por estabelecerem relações mais íntimas com os cães e gatos, por hábitos precários de higiene e também pela maior exposição ao ambiente contaminado (Guardabassi et al., 2004).

O reconhecimento dos fatores de virulência de *E. coli* relacionados à patogenicidade de infecções em cães contribui no entendimento da epidemiologia do agente, na adoção de medidas de controle, assim como dos reflexos em saúde

pública em face do estreito contato do homem com animais de companhia. Neste contexto foi proposto o presente estudo procurando avaliar, comparativamente, os principais fatores de virulência de linhagens de *E. coli* isoladas de ITU, piometra e fezes de cães.

Ao investigarem os achados hematológicos de cães com ITU atendidos em hospitais e clínicas nos EUA, Barsanti & Finco (1979) observaram que os animais com infecções na bexiga ou uretra apresentavam valores hematológicos usualmente normais. No mesmo estudo foi constatado que cães com infecções crônicas renais ou prostáticas também apresentavam hemogramas normais. Entretanto, ao investigarem cães com pielonefrite, prostatite bacteriana aguda ou com abscessos prostáticos, freqüentemente se depararam com leucocitose por neutrofilia. Cetin et al. (2003) na Turquia, assinalaram a leucocitose entre 17.000 e 22.000cél/μl como o achado hematológico mais freqüente em 100 cães com sinais de ITU.

No presente estudo, 11 (33,4%) animais com ITU apresentavam leucocitose por neutrofilia, variando entre 17.000 e 30.000cél/μl. Em consonância com esses resultados, Nelson & Couto (2003), também assinalaram a leucocitose por neutrofilia como achado clínico-laboratorial mais significativo em cães com ITU. Tais resultados provavelmente encontram justificativa no grande afluxo de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, relacionados às infecções bacterianas em órgãos internos, caracterizadas, hematologicamente, por leucocitose por neutrofilia (Stockham & Scott, 2002; Fransson, 2003).

Na literatura consultada são escassas as citações a respeito de anemia e trombocitopenia em animais com infecção do trato urinário. Dentre os 51 animais com ITU estudados, 51,5% apresentaram-se anêmicos e 33,4% com trombocitopenia. A presença de trombocitopenia nos cães com ITU poderia ser justificada pela redução no número destas células em infecções bacterianas graves. Nesses casos, a redução do número de plaquetas decorre de mecanismos multi-fatoriais, incluindo supressão da medula óssea por mediadores químicos da inflamação, alterações na megacariocitopoiese ou trombopoiese e/ou infecção direta de megacariócitos ou precursores hematopoiéticos (Stockham & Scott, 2002).

A anemia nos animais com ITU se reflete na presença de doença crônica, sendo reconhecida como anemia da inflamação. Esta é justificada pela liberação de mediadores químicos da inflamação, alterações na mobilização e utilização de ferro, além de modificação na produção e na estrutura da membrana de eritrócitos, que induzem a redução da vida média na circulação e/ou na produção de hemácias na medula óssea (Feldman et al., 2000; Stockham & Scott, 2002; Fransson, 2003).

À semelhança das ITU em cães, Nelson & Feldman (1986) relataram aumento nas contagens de leucócitos em cadelas e gatas com piometra, com valores acima de 30.000cél/ $\mu$ l, decorrentes fundamentalmente, de neutrofilia. No mesmo estudo, também observaram anemia normocítica normocrômica que retornou a normalidade com o tratamento da piometra. Ao estudarem 112 cadelas com piometra, Schepper et al. (1987) encontraram 69% dos animais com anemia e 42,8% com leucocitose, mostrando valores entre 22.000 e 44.000cél/ $\mu$ l. Monocitose foi observada com maior freqüência nos animais que apresentaram anemia e leucocitose como achados de hemograma.

Kaymaz et al. (1999) encontraram 73,3% de leucocitose e 26,6% de anemia em 18 cadelas com piometra. Faldyna et al. (2001) em um grupo de 34 cadelas com piometra descreveram leucocitose por neutrofilia e monocitose em 62% dos animais. Bigliardi et al. (2004) relataram neutrofilia (15.000 – 60.000cél/ $\mu$ l) em 75% de 45 cadelas. Os outros parâmetros hematológicos estavam dentro da normalidade.

No presente estudo as 52 cadelas com piometra estudadas revelaram anemia em 69,2% e leucocitose em 76,9%, dos quais 57,7% apresentaram neutrofilia e monocitose. No Brasil, Prestes et al. (1991) investigando 25 casos de piometra em cães também ressaltaram a alta ocorrência de leucocitose no hemograma dos animais. Nelson & Couto (2003) afirmaram que a leucocitose por neutrofilia e monocitose, além de anemia são os achados mais comuns da piometra em cadelas.

À semelhança das ITUs em cães, a ocorrência de leucocitose por neutrofilia nas fêmeas encontra reflexo no elevado afluxo destas células em processos inflamatórios em órgãos e tecidos (Stockham & Scott, 2002; Fransson,

2003). A presença de monocitose em grande parte dos animais provavelmente decorre do aumento destas células em processos infecciosos de evolução crônica (Feldman et al., 2000; Stockham & Scott, 2002).

A trombocitopenia foi encontrada em metade dos animais com piometra (50,0%). Apesar deste resultado, este achado não tem sido citado por outros autores. À semelhança da leucocitose por neutrofilia, a trombocitopenia pode ocorrer em processos infecciosos graves decorrentes da liberação de mediadores químicos da inflamação, alterações na trombocitopoiese e megacariocitopoiese e/ou infecção direta de megacariócitos ou precursores hematopoiéticos (Stockham & Scott, 2002).

O conjunto destes resultados hematológicos no presente estudo sugerem que a presença de leucocitose por neutrofilia, aliada a trombocitopenia, poderiam ser indicativos de casos graves de piometra em cadelas por *E. coli*. Tais achados poderiam ser utilizados no estabelecimento do prognóstico dos animais e na decisão de resolução cirúrgica e/ou terapêutica dos casos.

A terapia dos casos de ITU e piometra em cães é fundamentada na utilização de antimicrobianos. Entretanto, nos casos mais graves ou crônicos de piometra indica-se a resolução cirúrgica do processo, preconizando a OSH. Tanto na ITU como na piometra a terapia deveria ser instituída com base no teste de sensibilidade microbiana. Pressupõe-se que as drogas de escolha para a terapia devem apresentar amplo espectro, custo acessível, indicação por via intra-venosa (casos de septicemia) e bons índices terapêuticos no trato genito-urinário (Tavares, 2003).

A despeito destas características do antimicrobiano ideal, por questões econômicas, desconhecimento técnico ou mesmo dificuldade de acesso a laboratórios, a escolha dos antimicrobianos recai na experiência profissional ou no apelo comercial de determinados produtos. Cresce também, de forma preocupante, a indicação destes fármacos por práticos que atuam em estabelecimentos comerciais do ramo de animais de companhia. Neste sentido, o uso indevido e indiscriminado dos antimicrobianos (sub-doses, superdoses, descontinuidade da terapia e “promotores de crescimento”) podem aumentar a pressão seletiva para linhagens multi-resistentes.

Como consequência, o consumo de alimentos contaminados ou mesmo o contato estreito com animais de companhia pode aumentar o risco de infecção do homem por bactérias multi-resistentes.

A resistência aos antimicrobianos tem sido reconhecida como problema emergente tanto na medicina humana como na veterinária. Existem quatro mecanismos principais de resistência, regulados por genes específicos: inativação ou modificação enzimática dos antimicrobianos, impermeabilidade da parede ou membrana bacteriana, expulsão ativa da droga por bomba de efluxo e alteração dos receptores alvo. As bactérias adquirem genes de resistência aos antimicrobianos por plasmídeos, transposons e integrons, que resultam em mutações nos genes responsáveis pelos sítios de ligação com as drogas ou na ativação de porções do cromossomo bacteriano. Uma vez adquiridos estes genes de resistência podem ser transferidos entre bactérias. Neste sentido, a habilidade de *E. coli* na transferência de resistência às drogas é motivo de preocupação continuada na área médica (George, 1996; Mateu & Martin, 2001; Poletto & Reis, 2005; Sayah et al., 2005).

Dentre os antimicrobianos utilizados no presente estudo, as fluorquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacina) e gentamicina foram os antimicrobianos mais efetivos nas linhagens de *E. coli* (Tabela 4). Yates (1996) estudando 30 cadelas com piometra também evidenciaram alta sensibilidade de *E. coli* a enrofloxacina e gentamicina. Villarroel et al. (2002), na Venezuela, investigando o perfil de sensibilidade de 538 estirpes de *E. coli* isoladas de cães com ITU observaram boa sensibilidade dos agentes para gentamicina, ampicilina e fluorquinolonas. Esses resultados são equivalentes ao presente estudo, com exceção da ampicilina que apresentou 28% ou mais de resistência nas estirpes isoladas de ITU e piometra.

Nos animais é notória a preocupação nos últimos anos com estudos envolvendo o perfil de sensibilidade de agentes aos antimicrobianos, assim como a emergência de linhagens multi-resistentes. Sanchez et al. (2002) estudando 21 linhagens de *E. coli* isoladas de urina de cães observaram resistência para sulfonamidas, tetraciclina, cefalosporinas e gentamicina. Contrariamente, no

presente estudo, a gentamicina foi uma droga eficaz para ITU, com mais de 70% de sensibilidade das linhagens.

Sayah et al. (2005) observaram as fluorquinolonas como o grupo de drogas mais eficazes no tratamento de infecções por *E. coli*. Estes dados são concordantes com o presente estudo uma vez que ciprofloxacina e norfloxacina aparecem como as drogas mais eficientes frente às estirpes de *E. coli* nos três grupos de estudo. A maior sensibilidade às fluorquinolonas pode ser explicada pelo fato de serem drogas relativamente novas (20 anos) para a medicina veterinária, o que se traduz por pouco tempo de exposição dos animais se comparado com outras drogas do mercado. No entanto, diversos autores têm relatado aumento crescente de resistência de *E. coli* frente as fluorquinolonas em outros países (Sárkozy, 2001; Webber & Piddock, 2001; Trott et al., 2004), fato que discorda dos achados do presente estudo, no qual as fluorquinolonas foram as drogas mais eficazes nos três grupos.

No Brasil, Von Sydow (2005) avaliando linhagens de *E. coli* isoladas de fezes de cães errantes observou 100% de sensibilidade para norfloxacina, 87,18% para enrofloxacin e 73,58% para gentamicina, resultados que assemelham-se com o perfil de sensibilidade do presente estudo. No entanto, os autores observaram alta sensibilidade das estirpes frente a sulfametoxazole (75,6%), resultado que distoa do presente estudo, no qual o fármaco mostrou baixa efetividade.

Adicionalmente, a presença de linhagens de *E. coli* multi-resistentes aos antimicrobianos em animais de companhia, ressalta para os reflexos em saúde pública, em virtude do risco de transmissão dessas bactérias dos animais para o homem, em face do estreito contato com esta espécie animal. Neste contexto, Maynard et al. (2004) referiram o isolamento de linhagens de *E. coli* multi-resistentes de suínos e de seus proprietários (incluindo familiares), após a introdução da estreptomicina como “promotor de crescimento” na suinocultura. O conjunto destes dados sugere que os animais de produção e de companhia podem atuar como fontes de infecção de *E. coli* multi-resistentes para o homem, fato reforçado pela semelhança filogenética, patotípica e genotípica entre ExPEC isoladas de homens e animais (Maynard et al., 2004; Guardabassi et al., 2004).



Estudo investigando o perfil de sensibilidade microbiana de *E. coli* isoladas de fossas domésticas, animais domésticos e selvagens, ambiente e água de rio em Michigan, USA, encontrou maiores taxas de resistência das linhagens com o uso de cefalosporinas (20,5%), tetraciclinas (28,1%) e sulfonamidas (13,9%). No mesmo estudo, os autores alertaram para a multi-resistência a três ou mais antimicrobianos em 4,3% das estirpes (Sayah et al., 2005). Estes resultados concordam com os encontrados nas 158 estirpes de *E. coli*, nos quais as sulfonamidas e derivados  $\beta$ -lactâmicos também apresentaram as maiores taxas de resistência, com 7,3% dos isolados resistentes a três ou mais antimicrobianos e 5,5% das estirpes a cinco ou mais drogas.

Esses resultados assinalam de forma preocupante a ocorrência de multi-resistência de linhagens de *E. coli* isoladas de ITU e piometra em cães. Salienta-se assim, a importância da realização dos testes de sensibilidade microbiana previamente a instituição da terapia, com vistas a atingir melhor efetividade e minimizar os riscos com a presença de estirpes multi-resistentes.

Os estudos de transmissão cruzada de *E. coli* patogênicas, multi-resistentes, entre o homem e os animais também têm sido motivo de preocupação entre os pesquisadores.

Maynard et al. (2004) investigando ExPEC isoladas de diferentes espécies animais e do homem, descreveram 60% de resistência às sulfonamidas e acima de 50% para tetraciclinas e ampicilina. A multi-resistência a três ou mais drogas foi observada em mais de 50% dos isolados, mostrando a similaridade de resistência entre estirpes isoladas de homens e animais. Sáenz et al. (2004) avaliando 515 *E. coli* isoladas de produtos de origem animal e de fezes de animais saudáveis e de homens, encontraram 17 estirpes multi-resistentes (até sete antimicrobianos), especialmente com o uso da ampicilina e sulfametoxazole. Estes dados são similares aos obtidos no presente estudo no qual 24 (47,1%) das estirpes de ITU e 07 (13,5%) de piometra foram resistentes à pelo menos três drogas, e 17 (33,3%) linhagens de ITU e 1 (1,9%) de piometra resistentes a cinco ou mais drogas.

Matute et al. (2004) estudando 35 *E. coli* isoladas de ITU de pacientes na Nicaraguá observaram 74% de resistência à amoxicilina e 63% para sulfatrimetoprim. Gentamicina foi efetiva em 88% das linhagens e ciprofloxacina em 70% dos isolados. Estes dados são similares aos obtidos nos cães do presente estudo, reforçando a similaridade entre as estirpes de *E. coli* isoladas do homem e animais.

Os estudos de vigilância são métodos de grande utilidade para se determinar as tendências da sensibilidade antimicrobiana das bactérias. Porém, estes estudos possuem validade temporal devido a capacidade das bactérias em desenvolverem mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Esta realidade pressupõe a necessidade de estudos continuados de sensibilidade bacteriana, especialmente para *E. coli*, em virtude dos diferentes mecanismos de resistência do agente e da possibilidade de transmissão destes fatores de virulência entre a espécie e, até mesmo, para outros gêneros (Villarroel et al., 2002).

A patogenicidade de estirpes de *E. coli* causadoras de piometra é semelhante às estirpes isoladas de infecções do trato urinário, no que tange aos fatores de virulência (Greene, 2006).

O desenvolvimento de infecções em sítios extra-intestinais por *E. coli* depende de mecanismos de aderência, invasão, replicação nas células do hospedeiro e produção de diferentes toxinas. Tais mecanismos são denominados fatores de virulência (Sousa, 2006). Dentre os principais fatores de virulência podem ser mencionados os sistemas de aderência (*fimH*, *papC* e *G*, *sfaS* e *afa*), de captação de ferro (*iucD*), toxinas (*hlyA* e *cnf-1*), além de proteínas que auxiliam na infectividade das UPEC (usp).

A similaridade entre a ocorrência de genes *fimH*, *papC*, *sfaS*, *afa*, *hlyA* e *cnf-1* isoladas de ITU e piometra em cães e a prevalência dos mesmos genes em isolados de ITU no homem, sugerem que os mecanismos de virulência das bactérias causadoras de infecções uterinas são similares aos requeridos para ITUs no homem e nos cães (Chen et al., 2003).

Nas infecções extra-intestinais o fenômeno da aderência de *E. coli* às células epiteliais é fundamental na patogenicidade do agente. A aderência é mediada por proteínas denominadas adesinas que podem ou não estar associadas com fímbrias (Garcia & Le Bouguéneq, 1992).

Em estudos com cães, gatos, aves e o homem, o gene codificador para a adesina *fimH* foi encontrado em mais de 80% das estirpes isoladas. Este achado é similar ao encontrado nos três grupos de *E. coli* estudados (ITU, piometra e fezes de animais saudáveis), ratificando a importância desta adesina na virulência de afecções extra-intestinais nos animais e no homem (Yamamoto et al., 1995; Andreu et al., 1997; Yuri et al., 1998; Chen et al., 2003; Johnson et al., 2003; Tiba, 2004; Rodríguez-Siek et al., 2005; Freitag et al., 2005; Santo et al., 2006).

De maneira similar, *fimH* também foi detectado em mais de 90% dos isolados dos três grupos. No entanto, a importância desta adesina na patogenicidade das UPECs torna-se questionável visto que é observada em mais de 90% dos isolados de fezes. Diversos autores também referem esta fímbria no epitélio bucal e em vasos sangüíneos (Johnson, 1991). Assim, permanece não totalmente esclarecida a participação de fímbria do tipo 1 na virulência de UPEC nos cães, a despeito da sua relevância como mecanismo de aderência (Mulvey et al., 2002; Oelschlaeger et al., 2002).

Pili associado com pielonefrite (pap) ou fímbria P é formado por duas subunidades mais comumente investigadas, denominadas papC e papG (Tiba, 2004).

Estudo conduzido na investigação de *papC* em mulheres com ITU revelou a presença da fímbria em 23% de *E. coli* isoladas (Andreu et al., 1997). No Brasil, Coogan et al. (2004) encontraram *papC* em 39,1% das estirpes de *E. coli* isoladas de cadelas com piometra, enquanto Von Sydow (2005) detectou o gene *papC* em 19,4% de estirpes de *E. coli* isoladas das fezes de cães. Estes dados assemelham-se aos obtidos nas 158 linhagens estudadas, nas quais foi detectado gene *papC* em 23,5% das linhagens isoladas de ITU, 36,5% de piometra e 18,2% das fezes. Contudo, outros estudos encontraram maior prevalência de *papC* em isolados de cães com ITU (Yuri et al., 1998; Féria et al., 2001b; Johnson et al. 2003). A similaridade dos estudos

com fímbria P em linhagens isoladas de afecções genito-urinárias no homem e animais reforçam o postulado que as bactérias causadoras de ITU e piometra descendem de um mesmo clone bacteriano, assim como a preocupação com o cão como reservatório de estirpes patogênicas para o homem.

No homem, outros autores encontraram o gene codificador para *papC* de *E. coli* em maiores índices, comparativamente ao presente estudo, principalmente em casos de ITU e nas fezes (Le Bouguéneq et al., 1992; Yamamoto et al., 1995; Blanco et al., 1995; Tiba, 2004; Rodriguez et al., 2004; Santo et al., 2006). Estes resultados apontam para maior participação de *papC* na patogenicidade das estirpes de *E. coli* das infecções urinárias no homem.

A adesina *papG* localiza-se na fímbria P. É composta por três variantes, das quais *G1* tem sido detectada predominantemente nas fezes, *GII* na pielonefrite e *GIII* em casos de cistite (Johnson, 1991; Johnson et al., 2002; Mulvey et al., 2002; Tiba, 2004)

A fração *papGI* foi observada em baixa freqüência por diversos autores em linhagens isoladas de ITU em cães, gatos e no homem (Féria et al., 2001a; Johnson et al., 2001; Tiba, 2004), variando entre 0 e 6% de ocorrência. No tocante aos isolados de piometra canina, Chen et al. (2003) não observaram a expressão deste alelo. Em estudos investigando a expressão de *papGI* em isolados das fezes de cães e aves, foi constatada baixa freqüência deste gene (Rodriguez-Siek et al., 2004). Nas 158 linhagens estudadas *papGI*, não foi detectada em nenhuma das linhagens dos animais. Estes resultados sugerem a baixa participação deste alelo de *pap* nas linhagens UPEC e em fezes na espécie canina.

A variante *papGII* é o alelo associado com pielonefrite, uma das mais graves complicações clínicas de ITU. A expressão deste alelo foi observada em 13% de isolados de *E. coli* na ITU felina (Freitag et al., 2005), em 22% de ITU canina (Féria et al., 2001a) e em mais de 17% de ITU humana (Tiba, 2004; Rodriguez-Siek et al., 2005). No presente estudo não foi encontrada a seqüência gênica de *GII* em linhagens de ITU. Como não foi realizada a diferenciação entre as manifestações

clínicas de ITU, não é possível afirmar que os animais estudados não apresentaram pielonefrite pelo fato dos isolados não possuírem *papGII*. Entretanto, diferentemente de Chen et al. (2003) que não observaram o alelo *GII* em isolados de piometra canina, o presente estudo revelou 5,8% dos isolados de piometra com este gene. Cabe salientar que a síndrome piometra em cães manifesta-se clinicamente de forma severa, principalmente com a tendência a cronicidade do processo. A pielonefrite é reconhecida como uma das graves complicações da piometra, o que justificaria, em parte, a presença de *GII* em determinadas estirpes isoladas.

Nos isolados de *E. coli* das fezes dos cães estudados não foi observado a presença de *GII*. Este resultado também foi assinalado em estudos similares em cães em outros países (Johnson et al., 2003; Chen et al. 2003). Em fezes de aves, Rodriguez et al. (2005) encontraram este alelo em 39,1% das linhagens de *E. coli*. Estes dados reforçam a baixa expressão de *GII* em isolados de fezes de cães, comparativamente a ocorrência do gene na pielonefrite em cães ou em isolados de fezes de aves.

O alelo *papGIII*, predominantemente relacionado à cistite no homem e animais, foi encontrado no presente estudo em 19,6% dos isolados de ITU. Tiba (2004) e Rodriguez-Siek et al. (2005) observaram resultados similares ao encontrarem *GIII*, respectivamente, em 14,2% e 25,5% de isolados de *E. coli* em homens acometidos de ITU. Outros estudos referem variações entre 33 a 100% de expressão de *GIII* em isolados de felinos, cães e homem (Féria et al., 2001a; Féria et al., 2001b; Freitag et al., 2005). Para os animais estudados com piometra, foram encontrados 28,8% das estirpes que possuíam *GIII*. A baixa ocorrência de *GIII* nas linhagens de *E. coli* estudadas oriundas de ITU e piometra sugere a participação de outras fímbrias nas infecções gênito-urinárias em cães. Adicionalmente, não há evidências concretas da presença de receptores para *papGIII* no endométrio, o que minimizaria o efeito desta fímbria na patogenicidade das *E. coli* no ambiente uterino (Chen et al., 2003).

No entanto, vale destacar que 16,4% das estirpes do grupo controle, isolados das fezes, foram positivas para *GIII*, salientando a importância da microbiota

intestinal como reservatório de UPEC para os cães e para o homem. Segundo Johnson et al. (2001), a presença de *papGIII* associada com cistites no homem e nos cães é o principal argumento para considerar o cão como reservatório de ExPEC para o homem, ressaltando, conseqüentemente, os reflexos desta espécie animal como portadores de linhagens virulentas para o homem.

A fímbria S é composta por subunidades, sendo *sfaS* a subunidade localizada na extremidade distal e responsável pela interação da bactéria com o epitélio renal e bexiga (Mulvey et al., 2002).

No homem, a expressão desta subunidade *sfaS* tem sido evidenciada em mais de 20% de isolados de *E. coli* em pacientes no Brasil (Tiba, 2004) e em outros países (Yamamoto et al., 1995; Yuri et al., 1998; Féria et al., 2001b; Johnson et al., 2003; Rodriguez et al., 2005; Freitag et al., 2005). No presente estudo, foram encontrados resultados similares visto que em 43,1% dos isolados de ITU foi detectado o gene da subunidade *sfaS*. À semelhança dos casos de ITU, nos animais com piometra *sfaS* foi detectado em 46,1%, achado que está em consonância com outros estudos no Brasil (Coogan et al., 2004) e em outros países (Chen et al., 2003), que também têm observado estreita relação entre a expressão gênica da fração *sfaS* e a ocorrência de piometra em cães.

O gene codificador da fímbria S também tem sido observado em isolados fecais no homem e animais. O presente estudo revelou que 34,5% das estirpes isoladas do grupo controle possuíam *sfaS*. Estudos similares em fezes de cães no Brasil (Von Sydow, 2005) e em outros países (Yuri et al., 1998; Chen et al., 2003) revelaram *sfaS* em mais de 27% das estirpes de *E. coli*. Em fezes humanas, a expressão de *sfaS* foi observada em 14% das linhagens do agente (Yamamoto et al., 1995).

Diferentemente da fímbria P, na qual as frações *G1*, *GII* e *GIII* foram identificadas em baixas freqüências ou mesmo não foram detectadas nos três grupos de estudo, o gene da fração *sfa* da fímbria S apresentou elevada relação com animais acometidos por ITU e piometra. Estes achados denotam a relevância deste fator de

virulência na patogenicidade de *E. coli* nestas formas clínicas de infecções extra-intestinais, assim como reforçam a provável origem entérica das linhagens de *E. coli* encontradas em infecções gênitó-urinárias em cães.

A adesina afa (afimbrial) foi encontrada em menor frequência no presente estudo, cerca de 1,9% de isolados de ITU e piometra e em nenhuma estirpe isolada das fezes. Ao contrário, em isolados de ITU no homem esta adesina tem sido observada em porcentagens iguais ou superiores a 64% (Yamamoto et al., 1995; Mulvey et al., 2002; Tiba, 2004). Estas adesinas possuem como receptor um antígeno do grupo sangüíneo Dr bem caracterizado no homem (Mulvey et al, 2002; Tiba, 2004). A ausência deste grupo sangüíneo em cães provavelmente justifique a baixa relação desta adesina com a ocorrência de infecções gênitó-urinárias por *E. coli* em cães, ou mesmo em outras espécies domésticas.

Além da fímbria P, fímbria S e adesina afimbrial referidas como fatores de virulência de UPEC, o presente estudo investigou o gene codificador da intimina eae. Esta adesina é codificada por linhagens de *E. coli* diarreiogênicas e também pelo sorotipo O157:H7, relatado como doença emergente no homem, em face da ocorrência de colite hemorrágica, trombocitopenia e SUH, geralmente fatal em crianças (Ribeiro, 2001; Rangel et al., 2002). Os bovinos são reconhecidos como a principal fonte de infecção do sorotipo O157:H7. No entanto, com o aumento da criação de cães e o estreitamento de contato com o homem, esta espécie animal poderia representar um elo na cadeia epidemiológica da doença. Contudo, o gene eae não foi detectado em nenhuma estirpe do presente estudo. Porém, Dantas (2002) observou mais de 5% de *E. coli* isoladas de crianças e cães no Brasil, com ou sem diarreia, carreando este gene. Entretanto, no mesmo estudo não foi observada associação com verotoxinas, o que indicaria a presença de outras DAEC não pertencentes ao sorotipo O157:H7. Apesar da ausência do gene eae nos 158 isolados de *E. coli* de cães, faz-se imprescindível a vigilância continuada do sorotipo O157:H7 em diversas espécies domésticas no intuito de esclarecer a epidemiologia da doença no Brasil.

As linhagens de *E. coli* que promovem infecções extra-entéricas necessitam de mecanismos adicionais de virulência para manter-se viáveis, incluindo a lise de células inflamatórias e a captação exógena do íon ferro.

A hemolisina é uma citolisina capaz de lisar eritrócitos, leucócitos, células endoteliais e renais, favorecendo a infecção do agente (Johnson et al., 1991; Reingold et al., 1999; Emody et al., 2003; Tiba, 2004; Trabulsi, 2005). Ao lisar eritrócitos capta o ferro exógeno, elemento necessário ao metabolismo bacteriano (Quinn & Carter, 1994). No presente estudo, o gene codificador para hemolisina (*hlyA*) foi encontrado em ITU e piometra em cerca de 33% dos isolados (Quadro 3). Estes dados são similares aos relatados por Garcia & Le Bougénéec (1996), Tiba (2004) e Rodriguez et al. (2005) que encontraram 30%, 25,3% e 31%, respectivamente, em isolados de ITU em homens. Em cães e gatos diferentes estudos têm apontado a expressão do gene *hlyA* em níveis iguais ou superiores a 41% (Yamamoto et al., 1995; Yuri et al., 1998; Féria et al., 2001b; Johnson et al., 2003; Freitag et al., 2005), valores semelhantes aos detectados nas 158 linhagens de *E. coli* estudadas.

À semelhança dos animais com ITU, 34,6% das linhagens isoladas de piometra possuíam *hlyA*. Este resultado concorda com os achados de Chen et al. (2003), que encontraram 52% de estirpes de *E. coli* isoladas de piometra, contendo o gene *hlyA*.

As linhagens isoladas das fezes foram o grupo de estudo que apresentou a menor expressão do gene *hly*, detectado em 12,7% dos isolados. Garcia & Lê Bougénéec (1996) obtiveram resultados equivalentes avaliando a presença de *hly* em *E. coli* isoladas das fezes de pacientes humanos. Também em pacientes humanos, Orskov et al. (1988) e Yamamoto et al. (1995) identificaram o gene *hly* em, respectivamente, 19,6% e 18% dos isolados. Em estudos com cães em outros países, Yuri et al. (1998) e Chen et al. (2003) encontraram a expressão do gene *hly* em valores superiores ao obtido no presente estudo, respectivamente, em 31% e 25% dos isolados.



Foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) a presença do gene *hlyA* nas linhagens obtidas dos animais estudados acometidos por ITU e piometra, comparativamente aos isolados das fezes. Estes resultados ratificam a importância da presença do gene *hlyA* e, conseqüentemente, da lise de células inflamatórias e eritrócitos como mecanismo de virulência na infecção e viabilidade da *E. coli* em ambientes extra-intestinais, notadamente na ITU e piometra em cães.

O fator necrosante citotóxico tipo 1 (*cnf-1*) é uma importante citotoxina facilitadora da disseminação bacteriana no lúmen da bexiga e do trato intestinal para a circulação sangüínea (Garcia & Le Bouguéneq, 1996; Zamora et al., 2000; Bouquet, 2001; Tiba, 2004). No homem, Tiba (2004) investigando fatores de virulência de ITU encontrou 18,5% de *cnf-1*. Blanco et al. (1995) e Yamamoto et al. (1995) detectaram, respectivamente, 28 e 48% das linhagens carreando este gene em pacientes com infecções urinárias. Andreu et al. (1997) ao estudarem mulheres com cistite observaram *cnf-1* em 47% das UPEC. Landraud et al. (2000), em pacientes hospitalizados ou não, encontraram *cnf-1*, respectivamente, em 33% e 34% das estirpes isoladas. Rodriguez et al. (2005) detectaram *cnf-1* em 27,5% de ITUs humanas, mostrando a relevância desta citotoxina em infecções urinárias no homem.

Em animais, Pohl et al. (1993) encontraram *cnf-1* em diversas espécies acometidas de várias afecções. Yuri et al. (1998) também evidenciaram a presença do fator necrosante em infecções em animais de companhia. Johnson et al. (2003) revelaram a expressão de *cnf-1* em 41% das linhagens de *E. coli* isoladas de ITU em cães. Em linhagens isoladas das fezes, estudos no Brasil e em diferentes países tem revelado também *cnf-1* em estirpes isoladas das fezes de cães, em porcentagens variando de 12% a 81,5% (Pohl et al., 1995; Yuri et al., 1998; Chen et al., 2003; Johnson et al. 2003; Von Sydow, 2005). No presente estudo, a presença do gene *cnf-1* foi detectada em 11 (21,6%) isolados de ITU, 21 (40,4%) de piometra e em 9 (16,4%) das fezes.

A despeito das variações de detecção de *cnf-1* em outros estudos em cães, nos isolados dos animais acometidos por piometra e ITU foi observada diferença

estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para as linhagens obtidas das fezes. Estes resultados sugerem que as linhagens que possuem *cnf-1* seriam dotadas de mecanismo adicional de virulência nas afecções extra-intestinais em cães, incluindo ITU e piometra. Adicionalmente, a detecção de linhagens de *E. coli* detentoras de *cnf-1* nos cães, reconhecida como citotoxina relacionada à infecções entéricas e extra-entericas no homem, ressalta para os reflexos em saúde pública da presença de linhagens virulentas, em virtude da proximidade de contato e/ou co-habitação do homem com os cães.

Evidências apontam que *cnf-1* e *hlyA* atuariam em conjunto favorecendo a infecção por linhagens produtoras destas citotoxinas (Landraud et al., 2000; Boquet et al., 2001; Tiba, 2004, Tavechio et al., 2004). Ambas *cnf-1* e *hlyA*, e ainda a fímbria *p* se encontram em uma mesma ilha de patogenicidade. Esses fatores de virulência são expressados, geralmente, em porcentagens semelhantes, passíveis de transmissão por plasmídeos e detactados associados em diversas estirpes de *E. coli* (Gyles et al., 1992). No presente estudo observamos perfil semelhante a estes achados, visto que estes fatores de virulência foram detectados em proporções semelhantes entre os três grupos, sugerindo que *cnf-1*, *hlyA* e fímbria *p* estão em uma mesma ilha de patogenicidade na maioria das linhagens isoladas. No grupo controle também foi evidenciada a expressão destes genes o que demonstra que esta PAI pode ser transmitida entre linhagens patogênicas e comensais. Assim, sugere-se que este grupo gênico contribui na virulência de estirpes ligadas às infecções genito-urinárias em cães.

Para que o sorotipo O157:H7 seja devidamente caracterizado, faz-se necessário a detecção das verotoxinas, além do gene codificador de *eae*. Nenhuma das 158 linhagens estudadas apresentou os genes *eae*, *vt1* e *vt2*.

Rangel et al. (2005) realizando levantamento epidemiológico nos EUA, entre 1982 e 2002, observaram 73.000 casos de infecções por O157:H7, 350 surtos, 1493 hospitalizações, 353 casos de SUH que culminaram com 40 mortes. As principais formas de transmissão incriminadas foram os alimentos. O contato com

animais foi responsável por 3% destes casos, sendo que os cães não foram apontados nestas estatísticas.

No Brasil, Dantas (2002) não encontrou o gene das verotoxinas nas fezes de crianças e de cães com ou sem diarreia. Von Sydow (2005) detectou 0,5% das estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de cães errantes expressando *vt2*. O conjunto desses dados provavelmente apontam que o cão tem baixo risco ou participação na veiculação para o homem de linhagens verotoxigênicas.

*E. coli* necessitam de ferro para o metabolismo bacteriano. Este elemento é abundante no intestino, porém não é encontrado de forma livre em sítios extra-intestinais. Ao colonizarem o sistema urogenital o agente utiliza mecanismos de captação de ferro que incluem as hemolisinas e os sideróforos (Johnson, 1991; Braun et al., 1999; Braun et al., 2002, Faraldo-Gomez et al., 2003). A aerobactina é considerado o sistema de captação mais efetivo para linhagens UPEC (Orskov et al., 1988). O gene *iucD* é codificador da aerobactina. No presente estudo, a presença de *iucD* foi observada em 23,5% dos isolados de ITU, 17,3% de piometra e em 1,8% de fezes. Em pacientes humanos com ITU a detecção do gene tem sido encontrada com variações entre 25,9 e 76% (Orskov et al., 1988; Yamamoto et al., 1995; Féria et al., 2001b; Tiba, 2004; Santo et al., 2006). Na piometra canina, Chen et al. (2003) revelaram *iucD* em 8% da amostragem. No Brasil, Coogan et al. (2004) encontraram expressão de *iucD* em 17,4% de estirpes isoladas de cadelas com piometra.

A expressão gênica de *iucD* foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nos animais estudados com piometra e ITU, em detrimento do grupo controle. À semelhança dos achados de *hly*, a captação de ferro exógeno, mediante a produção de sideróforos, parece desempenhar papel importante na infectividade de *E. coli* em casos de piometra e ITU em cães. No entanto, diferente do supracitado, Chen et al. (2003) referem que *iucD* e *afa* são fatores de virulência que menos contribuem na patogenicidade de linhagens de *E. coli* nas infecções uterinas em cadelas.

Recentemente foi descrita a proteína uropatogênica específica (*usp*) associada à linhagens virulentas encontradas no trato urinário (Kurazono et al., 2000;

Kurazono et al., 2003; Tiba, 2004). No presente estudo foram encontrados 33,3% nos isolados de ITU e 69,2% de piometra que possuíam o gene *usp*. No grupo controle este gene não foi detectado. Tiba (2004) encontrou *usp* em 22,2% de isolados de ITU em pacientes humanos. Kurazono et al., (2000, 2003) referem 80% dos isolados de cistite humana e 24% em fezes de homens expressando o gene *usp*. Ainda são escassos os estudos relacionando a proteína específica uropatogênica às infecções em animais. No entanto, a ocorrência do gene *usp* em ITU no presente estudo sugere sua relevância na patogenicidade de *E. coli* em infecções urinárias de cães. Dentre a literatura consultada não foi possível encontrar estudos investigando a participação de *usp* na piometra em cães. Entretanto, em face da elevada ocorrência do gene *usp* nas linhagens de *E. coli*, no presente estudo, e da provável origem entérica ou peri-anal das linhagens causadoras de ITU e piometra em cães, sugere-se que *usp* teria participação importante na infectividade de estirpes em afecções do sistema gênito-urinário.

Nas linhagens isoladas de ITU e piometra foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) a presença simultânea dos genes para proteína específica uropatogênica (*usp*), aerobactina (*iucD*) e a multi-resistência *in vitro* a cinco ou mais antimicrobianos. Esses dados apontam que as linhagens que contém este conjunto de fatores de virulência deteriam mecanismos adicionais na patogenicidade em infecções gênito-urinárias em cães, e que a ocorrência simultânea nas linhagens poderia decorrer de provável transmissão plasmidial desses fatores de virulência em conjunto.

O estudo ressalta a intensa resposta inflamatória no exame hematológico dos cães com piometra e ITU, similaridade das adesinas entre as linhagens isoladas nos três grupos estudados e alta ocorrência de expressão simultânea de *hlyA*, *cnf-1* e fímbria P. A elevada multi-resistência das linhagens aos antimicrobianos nos cães com ITU e piometra, reforça a necessidade de estudos continuados de sensibilidade bacteriana, principalmente *E. coli*. Ressalta-se para os reflexos em saúde pública representados pela detecção de linhagens de *E. coli* patogênicas em cães com ITU e piometra em face do estreito contato do homem com os cães.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- Os principais achados clínico-laboratoriais nos animais foram anemia, trombocitopenia, leucocitose por neutrofilia e monocitose condizentes, geralmente, com infecções bacterianas graves em cães com piometra e infecções urinárias;
- O perfil de sensibilidade microbiana revelou que a gentamicina e as fluorquinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacina e norfloxacina) foram os antimicrobianos mais efetivos em Botucatu e região, podendo ser indicados como de escolha na terapia de ITU e piometra em cães;
- Alta frequência de resistência múltipla aos antimicrobianos foi observada nas linhagens, especialmente para ampicilina e sulfametoxazole/trimetoprim - drogas consideradas de escolha na terapia de afecções genito-urinárias em cães -, ratificando a importância dos testes de sensibilidade microbiana antes da instituição da terapia;
- Os genes *hlyA*, *iucD* e *cnf-1* apresentaram significância estatística nas linhagens isoladas de piometra e ITU, comparativamente aos isolados das fezes, representando importantes mecanismos de virulência para as linhagens ExPEC nas afecções genito-urinárias em cães, decorrente da ação de lise de células inflamatórias e/ou captação do íon ferro;
- O gene *fimH* foi observado em mais de 90% dos isolados nos três grupos de estudo, não representando, provavelmente, um fator essencial à patogenicidade de linhagens ExPEC em infecções genito-urinárias em cães;
- O gene codificador de adesina afimbrial (*afa*) foi encontrado em baixa frequência nos três grupos de estudo, não se constituindo, provavelmente, em

mecanismo importante para a adesão de linhagens ExPEC nas infecções gêno-urinárias em cães;

- A presença do gene *cnf-1* foi estatisticamente significativa nas linhagens de ITU e piometra comparativamente aos isolados fecais, confirmando sua importância como fator de virulência no que tange a lise celular e facilitação da disseminação bacteriana pelo sistema gêno-urinário em cães;

- A presença da proteína específica uropatogênica (*usp*) apresentou diferença estatisticamente significativa nas linhagens de piometra comparativamente às isoladas de ITU e fezes, resultado infreqüente, mas que poderia decorrer da origem comum das linhagens que acometem o trato urinário e o útero dos cães;

- Os genes *papC* e *papGIII*, sub-unidades da fímbria P, e a fímbria S, foram encontrados em alta freqüência nas linhagens isoladas de ITU e piometra, indicando a importância destes fatores de virulência no mecanismo de adesão ao epitélio gêno-urinário em cães,

- Não foram encontradas estirpes detentoras dos genes para verotoxinas e da intimina *eae* nas linhagens estudadas, mostrando que, provavelmente, o cão é de baixo risco como fonte de infecção de linhagens verotoxigênicas para o homem;

- A associação gênica mais freqüente nas linhagens foi observada entre *papC*, *papGIII*, *sfaS*, *cnf-1* e *hlyA*, mostrando que linhagens dotadas do conjunto destes fatores de virulência apresentariam maior probabilidade de exercer efeito patogênico nas infecções gêno-urinárias em cães;

- Fatores de virulência com relevância em saúde pública foram detectados nos cães estudados, com destaque para linhagens multi-resistentes aos antimicrobianos e necrotoxigênicas, conotando eventual risco de transmissão cruzada de estirpes patogênicas, em face do estreito contato do cão com o homem.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3.ed. Washington: Organización Panamericana de La Salud, 2001. 398p.

ANDERSON, G.G.; DODSON, K.W.; HOOTON, T.M.; HULTGREN, S.J. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. **Trends Microbiol.**, v.12, n.9, p.424-430, 2004.

ANDREU, A.; STAPLETON, A.E.; FENNEL, C.; LOCKMAN, H.A.; XERCAVINS, M.; FERNANDEZ, F.; STAMM, W.E. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* strains causing prostatitis. **J. Infect. Dis.**, v.176, p.464-469, 1997.

BARSANTI, J.A.; FINCO, D.R. Laboratory findings in urinary tract infection. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.9, n.4, p.729-748, 1979.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRES, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.

---

\* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.  
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

BIGLIARDI, E.; PARMIGIANI, E.; CAVIRANI, S.; BONATI, L.; CORRADI, A. Ultrasonography and cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **Reprod. Domest. Anim.**, v.39, p.136-140, 2004.

BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J.E.; ALONSO, M.P.; ABALIA, I.; RODRIGUEZ, E.; BILBAO, J.R.; UMARAN, A. Factores de virulencia y serogrupos o de *E. coli* causantes de infecciones urinarias comunitarias. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v.13, p.236-241, 1995.

BONAGURA, J.D. **Kirk's current veterinary therapy XIII small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 2000. 1308p.

BOQUET, P. The cytotoxic necrotizing factor 1 (cnf1) from *Escherichia coli*. **Toxicon**, v.39, p.1673-1680, 2001.

BRAUN, V.; KILLMANN, H. Bacterial solutions to the iron supply problem. **TIBS**, v.24, p.104-109, 1999.

BRAUN, V.; BRAUN, M. Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. **FEBS Lett.**, v.529, p.78-85, 2002.

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



CETIN, C.; SENTÜRK, S; KOCABIYIK, A.L.; TEMIZEL, M.; ÖZEL, E. Bacteriological examination of urine samples from dogs with symptoms of urinary tract infection. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v.27, p.1225-1229, 2003.

CHANTREY, J.; CHAPMAN, P.S.; PATTERSON-KANE, J.C. Haemolytic-uraemic syndrome in a dog. **J. Vet. Med.**, v.49, p.470-472, 2002.

CHEN, I.M.M.; WRIGHT, P.J.; LEE, C.; BROWNING, G.F. Uropathogenic virulence factors in isolated of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. **Vet. Microbiol.**, v.94, p.57-69, 2003.

COOGAN, J.A.; OLIVEIRA, C.M.; FAUSTINO, M.; MORENO, A.M.; VON SYDOW, A.C.; MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R. Estudo microbiológico de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra e pesquisa de fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli*. **Arq. Inst. Biol.**, v.71, p.513-515, 2004.

DANTAS, L.O. **Marcadores genéticos de virulência de *Escherichia coli* diarreiogênicas em cães com e sem diarreia: importância em saúde pública.** 2002. 82p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

EDWARDS, P.R.; EWING, W.H. **Identification of enterobacteriaceae.** 3.ed. Minnesota: Burgess, 1972. p.7-47.

EMÖDY, L.; KERÉNYI, M.; NAGY, G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.22, p.29-33, 2003.

FALDYNA, M.; LAZNICKA, A.; TOMAN, M. Immunosuppression in bitches with pyometra. **J. Small. Anim. Pract.**, v.42, p.5-10, 2001.

FARALDO-GÓMEZ, J.D.; SANSOM, M.S.P. Acquisition of siderophores in gram negative bacteria. **Nat. Rev.**, v.4, p.105-116, 2003.

FELDMAN, B.F.; ZENKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Canada: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.

FÉRIA, C.; MACHADO, J.; CORREIA, J.D.; GONÇALVES, J.; GAASTRA, W. Distribution of papG alleles among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from different species. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.202, p.205-208, 2001a.

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*. **Vet. Microbiol.**, v.82, p.81-89, 2001b.

FERREIRA, C.R.; LOPES, M.D. Complexo hiperplasia cística endometrial/piometra em cadelas – revisão. **Clin. Vet.**, n.27, p.36-44, 2000.

FODE-VAUGHAN, K.A; MAKI, J.S.; BENSON, J.A.; COLLINS, M.L.P. Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.37, p.238-243, 2003.

FRANSSON, B.A. **Systemic inflammatory response in canine pyometra**. 2003. 49p. Tese (Doutorado) – Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

FRANSSON, B.A.; RAGLE, C.A. Canine piometra: an update on pathogenesis and treatment. **Compendium**, v.25, n.8, p.602-612, 2003.

FREITAG, T.; SQUIRES, R.A.; SCHMID, J.; ELLIOT, J. Feline uropathogenic *Escherichia coli* from Great Britain and New Zeland have dissimilar virulence factor genotypes. **Vet. Microbiol.**, v.106, p.79-86, 2005.

GARCIA, M.I.; LE BOUGUÉNEC, C. Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*. **Bull. Inst. Pasteur**, v.94, p.201-236, 1996.

GEORGE, A.M. Multidrug resistance in enteric and other gram negative bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.139, p.1-10, 1996.

GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3.ed. Canada: Saunders/Elsevier, 2006. 1387p.

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

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

HACKER, J. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. **Can. J. Microbiol.**, v.38, p.720-727, 1992.

HEILBERG, I.P.; SCHOR, N. Infecção do trato urinário inferior. In: GIRÃO, M.J.B.C.; LIMA, G.R.; BARACAT, E.C. (Eds). **Uroginecologia**. São Paulo: Artes Médicas, 1997. p.131-140.

JARVINEM, A.K. Urogenital tract infection in the bitch. **Vet. Res. Commun.**, v.4, p.253-269, 1980.

JOHNSON, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.4, n.1, p.80-128, 1991.

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

JOHNSON, J.R.; KASTER, N.; KUSKOWSKI, M.A.; LING, G.V. Identification of virulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n.1, p.337-345, 2003.

KAIPAINEM, T.; POHJANVERTA, T.; SHPIGEL, N.Y.; SHWIMMER, A.; PYORALA, S.; PELKONEN, S. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. **Vet. Microbiol.**, v.85, p.37-46, 2002.

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

KAU, A.L.; HUNSTAD, D.A.; HULTGREN, S.J. Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.8, p.54-59, 2005.

KAYMAZ, M.; BASTAN, A.; ERUNAL, N.; ASLAN, S.; FINDIK, M. The use of laboratory findings in the diagnosis of ceh-pyometra complex in the bitch. **Tr. J. Vet. Anim. Sci.**, n.23, p.127-133, 1999.

KRIEG, N.R.; HOIT, J.C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 984p.

KURAZONO, H.; YAMAMOTO, S.; NAKANO, M.; NAIR, G.B.; TERAJ, A.; CHAICUMPA, W.; HAYASHI, H. Characterization of a putative virulence island in the

chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. **Microbial Pathogenesis**, v.28, p.183-189, 2000.

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

LANDRAUD, L.; GAUTHIER, M.; FOSSE, T.; BOQUET, P. Frequency of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor (cnf1) in nosocomial urinary tract infections. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.30, n.3, p.213-216, 2000.

Le BOUGUÉNEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of pap, afa and sfa adhesion-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, n.5, p.1189-1193, 1992.

MARRS, C.F.; ZHANG, L.; FOXMAN, B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are the distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? **FEMS Microbiol. Lett.**, v.252, p.183-190, 2005.

MATEU, E.; MARTIN, M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? **J. Vet. Med.**, v.48, p.569-581, 2001.

MATUTE, A.J.; HAK, A.; SCHURINK, C.A.M.; McARTHUR, A. ALONSO, E.; PANIAGUA, M.; vanASBECK, E.; ROSKOTT, A.M.; FROELING, F.; ROZENBERG-ARSKA, M.; HOEPELMAN, I.M. Resistance of uropathogens in symptomatic urinary tract infections in León, Nicaragua. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.23, p.506-509, 2004.

MAYNARD, C.; BEKAL, S.; SANSCHAGRIN, F.; LEVESQUE, R.C.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L.; LARIVIÉRE, S.; HAREL, J. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates from animal and human origin. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, n.12, p.5444-5452, 2004.

MENG, J.H.; ZHAO, S.; DOYLE, M.P.; MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S. Polymerase chain reaction for detecting *Escherichia coli* O157:H7. **Int. J. Food Microbiol.**, v.32, p.103-113, 1996.

MOURA, C. **Caracterização de amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com e sem diarreia**: pesquisa de fatores de colonização e toxinas. 2005. 64p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MULVEY, M.A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. **Cel. Microbiol.**, v.4, n.5, p.257-271, 2002.

NAKANO, M.; YAMAMOTO, S.; TERAJ, A.; OGAWA, O.; MAKINO, S.; HAYASHI, H.; NAIR, G.B.; KURAZONO, H. Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.205, p.71-76, 2001.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) – **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.** 9.ed. Pennsylvania: NCCLS, 1999. 103p.

NELSON, R.W.; FELDMAN, E.C. Pyometra. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.16, n.3, p.561-576, 1986.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Small animal internal medicine.** 3.ed. St. Louis: Mosby, 2003. 1362p.

NICHOLS, P.R.; MORRIS, D.O.; BEALE, K.M. A retrospective study of canine and feline cutaneous vasculitis. **Vet. Dermatol.**, v.12, n.5, p.255-264, 2001.



OELSCHLAEGER, T.A.; DOBRINDT, U.; HACKER, J. Virulence factors of uropathogens. **Curr. Opin. Urol.**, v.12, p.33-38, 2002.

ORSKOV, C.; SVANBORG, E.; ORSKOV, F. Aerobactin production of serotyped *Escherichia coli* from UTI. **Med. Microbiol. Immunol.**, v.177, p.9-14, 1988.

PRESTES, N.C.; LOPES, M.D.; BICUDO, S.D.; OBA, E.; VULCANO, L.C.; LANGONI, H.; KOHAYAGAWA, A. Piometra canina: aspectos clínicos, laboratoriais e radiológicos. **Semina**, n.12, v.1, p.53-56, 1991.

POHL, P.; OSWALD, E.; VAN MUYLEM, K.; JACQUEMIN, E.; LINTERMANS, P.; MAINIL, J. *Escherichia coli* producing cnf1 and cnf2 cytotoxins in animal with different disorders. **Vet. Res.**, v.24, p.311-315, 1993.

POLETO, K.Q.; REIS, C. Susceptibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na cidade de Goiânia, Go. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.38, n.5, p.416-420, 2005.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.M.; CARTER, G.R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648p.

RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 9.ed. London: W.B. Saunders, 2000. 1880p.

RANGEL, J.M.; SPARLING, P.H.; CROWE, C.; GRIFFEN, P.M.; SWERDLOW, D.L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. **Emerg. Infect. Dis.**, v.11, n.4, p.1-14, 2005.

REINGOLD, J.; STARR, N.; MAURER, J.; LEE, M.D. Identification of a new *Escherichia coli* She haemolysin homolog in avian *E. coli*. **Vet. Microbiol.**, v.66, p.125-134, 1999.

RIBEIRO, M.G. **Fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina clínica e subclínica.** 2001. 98p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S.; FERREIRA, A.J.P.; SILVA, A.S.; DELLA COLLETA H.H.M. Fator necrosante citotóxico em *Escherichia coli* isolada de mastite clínica bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.54, n.6, p.648-650, 2002.

RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S.; LANGONI, H.; GARINO JUNIOR, F.; VICTÓRIA, C.; LISTONI, F.J.P. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.5, p.724-731, 2006.

RODRIGUEZ-SIEK, K.E.; GIDDINGS, C.W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T.J.; FAKHR, M.K.; NOLAN, L.K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**, v.151, p.2097-2110, 2005.

ROMAGNOLI, S. Canine pyometra: pathogenesis, therapy and clinical cases. **WSAVA Congress**, p. 1-5, 2002. Disponível em:<<http://www.vin.com>>. Acesso em 16 fev. 2005.

ROTERMUND, A.; NOLTE, I.; PETERS, M.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M. Cutaneous and renal glomerular vasculopathy in a great dane resembling “Alabam rot” of greyhounds. **Vet. Rec.**, v.151, n.17, p.510-512, 2002.

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

SAÉNZ, Y.; BRIÑAS, L.; DOMÍNGUEZ, E.; RUIZ, J.; ZARAZAGA, M.; VILA, J.; TORRES, C. Mechanisms of resistance in multiple antibiotic resistant *Escherichia coli* strains of human, animal and food origins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, n.10, p.3996-4001, 2004.

SANCHEZ, S.; STEVENSON, M.A.A.; HUDSON, C.R.; MAIER, M.; BUFFINGTON, T.; DAM, Q.; MAURER, J.J. Characterization of multidrug resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.10, p.3586-3595, 2002.

SANDHOLM, M.; VASENIUS, H.; KIVISTÖ, A.K. Pathogenesis of canine pyometra. **JAVMA**, v.167, n.11, p.1006-1010, 1975.

SANTO, E.; MACEDO, C.; MARIN, J.M. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.48, n.4. p.185-188 , 2006.

SÁRKÖZY, G. Quinolones: a class of antimicrobial agents. **Vet. Med Czech.**, v.46, n.9-10, p.257-274, 2001.

SAYAH, R.S.; KANEENE, J.B.; JOHNSON, Y.; MILLER, R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic and wild animal fecal samples, human septage and surface water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.7, n.8, p.1394-1404, 2005.

SCHEPPER, J.; STOCK, J.V.; CAPIAU, E. Anaemia and leucocytosis in one hundred and twelve dogs with pyometra. **J. Small Anim. Pract.**, n.28, p.137-145, 1987.

SCHOR, N.; SROUGI, M. **Nefrologia, urologia clínica**. São Paulo: Sarvier, 1998. 510p.

SOUSA, C.P. The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. **J. Venom. Anim. Toxins Ind. Trop. Dis.**, v.12, n.3, p.363-373, 2006.

STAMM, W.E.; HOOTON, T.M. Management of urinary tract infection in adults. **NEJM**, v.329, n.28, p. 1328-1334, 1993.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 1216p.

TAVECHIO, A.T.; MARQUES, L.R.M.; ABE, C.M.; GOMES, T.A.T. Detection of cytotoxic necrotizing factor types 1 and 2 among fecal *Escherichia coli* isolates from brazilian children with and without diarrhea. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, n.1, p.81-83 , 2004.

TIBA, M.R. **Determinação genotípica dos fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de cistites**. 2004. 72p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p.

TRIOLA, M.F. **Introdução à estatística**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999.

TROTT, D.J; FILIPPICH, L.J.; BENSINK, J.C; DOWS, M.T.; MCKENZIE, S.E; TOWNSEND, K.M.; MOSS, S.M.; CHIN, J.J.C. Canine model for investigating the impact of oral enrofloxacin on commensal coliforms and colonization with multidrug-resistant *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, v.53, p.439-443, 2004.

USEIN, C.R.; DAMIAN, M.; TATU-CHITOIU, D.; CAPUSA, C.; FAGARAS, R.; TUDORACHE, D.; NICA, M.; LE BOUGUÉNEC, C. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains from Romanian adult urinary tract infections cases. **J. Cell. Mol. Med.**, v.5, n.3, p.303-310, 2001.

VERONESI, R.F. **Tratado de infectologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 2167p.

VILLARROEL, E.; NAVARRO, P.; RAMOS, R.; ANDRADE, E.; BOLIVAR, A.; MARCANO, J. *Escherichia coli* identificadas em pacientes com infecciones urinarias: sensibilidad antimicrobiana. **Rev. Soc. Venez. Microbiol.**, v.22, n.1, p.1-6, 2002.

VON SYDOW, A.C.M.DEL G. **Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* em fezes de cães errantes**. 2005. 88p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

YAMAMOTO, S.; TSUKAMOTO, T.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Distribution of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from urine of cystitis patient. **Microbiol. Immunol.**, v.39, p.401-404, 1995.

YAMAMOTO, S.; NAKANO, M.; TERAJ, A.; YURI, K.; NAKATA, K.; NAIR, G.B.; KURAZONO, H.; OGAWA, O. The presence of the virulence island containig the usp gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. **J. Urol.**, v.165, p.1347-1350, 2001.

YATES, D.G. The antimicrobial sensitivity of bacteria isolated from 30 cases of pyometra in the bitch. **Irish Vet. J.**, v.49, n.12, p.709-710, 1996.

YURI, K.; NAKATA, K.; KATAE, H.; YAMAMOTO, S.; HASEGAWA, A. Distribution of uropathogenic virulence factors among *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. **J. Vet. Med. Sci.**, v.60, n.3, p.287-290, 1998.

YURI, K.; NAKATA, K.; KATAE, H.; YAMAMOTO, S.; TSUKAMOTO, T.; HASEGAWA, A. Serotypes and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. **J. Vet. Med. Sci.**, v.61, n.1, p.3748, 1998.

ZAMORA, J.; REINHARDT, G.; POLETTE, M.; MACIAS, P.; GONZÁLEZ, I. *Escherichia coli* aislada de cerditos diarreicos. Presunción de cepas productoras del factor citotóxico necrosante (cnf). **Arch. Med. Vet.**, v.32, n.1, p.1-7, 2000.

WEBBER, M.; PIDDOCK, J.V. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. **Vet. Res.**, v.32, p.275-284, 2001.