

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
Programa de Mestrado em Medicina Veterinária

**Caracterização de *Escherichia coli* patogênica
extraintestinal (ExPEC) dos sorotipos O2 e O25
de diferentes origens animais**

Summaia Farah

*Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária da
Universidade Paulista – UNIP para obtenção
do Título de Mestre em Medicina Veterinária.
Orientadora: Profª Drª Vania Maria de Carvalho*

SÃO PAULO
2011

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

Programa de Mestrado em Medicina Veterinária

**CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGENICA
EXTRAINTESTINAL (EXPEC) DOS SOROTIPOS O2 E O25
DE DIFERENTES ORIGENS ANIMAIS**

Summaia Farah

*Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária da
Universidade Paulista – UNIP para obtenção
do Título de Mestre em Medicina Veterinária.
Orientadora: Profª Drª Vania Maria de Carvalho*

SÃO PAULO

2011

Farah, Summaia.

Caracterização de *Escherichia coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) dos sorotipos O2 e O25 de diferentes origens animais. / Summaia Farah. – São Paulo, 2011.

42 f. il. Color.

Dissertação (mestrado) – Apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista, São Paulo, 2011.

Área de Concentração: Imunopatologia Veterinária

“Orientação: Prof^a. Dr^a. Vania Maria de Carvalho”

Agradecimentos

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por me apoiar neste trabalho através do fornecimento da bolsa de estudos.

À Juliana e ao João por me fornecerem as amostras utilizadas neste trabalho.

À Lika por, além de me fornecer suas amostras, responder as minhas dúvidas sempre com disposição e com um sorriso no rosto. Agradeço sua atenção, paciência e principalmente os conhecimentos transmitidos.

Obrigada Suzana e Cleide pela amizade e simpatia espontâneas, pelas tantas placas que vocês fizeram para mim e as inúmeras vezes que autoclavaram todo meu material.

Obrigada Renata e Vanessa por me ajudarem com minhas dúvidas e serem tão simpáticas e acolhedoras.

Agradeço aos professores Guilherme, Mario, Lúcia e Leoni pelas suas ótimas aulas e pelo conhecimento passado para mim durante o mestrado.

À Prof^a. Ivana, sempre, pelas suas aulas durante o mestrado e por seu carinhoso acolhimento e paciência em me ensinar, desde a iniciação científica. Obrigada!!!

À Prof^a. Selene pela ajuda em conseguir minha bolsa de estudos, pelo estágio em suas aulas e por me ensinar um pouquinho do seu vasto conhecimento sobre fungos.

Um agradecimento muito especial à minha orientadora Vania, obrigada pela sua imensa paciência, compreensão e apoio, e, também, por tudo que você me deu em conhecimentos e ensinamentos. Muito obrigada !!!

Ao meu anjo da guarda aqui na terra...

Resumo

Escherichia coli é uma bactéria comensal de intestino dos animais de sangue quente. Ao longo da escala evolutiva, porém, vários clones adquiriram fatores de virulência (FV) específicos tornando-se patogênicos para homens e animais. As *E. coli* patogênicas podem ser divididas em dois grupos distintos: *E. coli* diarreiogênicas e as que causam doenças extra-intestinais – chamadas genericamente de ExPEC. As ExPEC são consideradas importantes patógenos relacionados à Saúde Pública, e estão relacionadas, também, a doenças animais. Neste trabalho, houve o objetivo do estudo do perfil de virulência, e a relação deste com a resistência a antibióticos em amostras de ExPEC dos sorogrupos O2 e O25, isoladas de infecções urinárias de cães e gatos, piometra canina e amostras fecais de fragatas de vida livre, aparentemente saudáveis. As amostras de *E. coli* foram analisadas por PCR para pesquisar genes que codificam FV específicos, incluindo: genes associados à expressão de adesinas (*fimH*, *papC*, *papEF*, *sfa*), invasina (*ibeA*), toxinas (*cnf1*, *hlyA*), sideróforos (*iucD*, *fyuA*), evasina (*traT*), plasmídeo ColV (*cvaC*) e ilha de patogenicidade (*malX*). A sensibilidade aos antimicrobianos foi pesquisada segundo os padrões internacionais. Todas as 19 amostras pesquisadas apresentaram variado número de genes de virulência, e as cepas O2 apresentaram maior média de genes de virulência (7,5) que as O25 (6,1). Todas as cepas foram positivas para os genes *fimH*, *fyuA* e *malX*, tendo os isolados O2 maior frequência dos genes *pap*, *cnf1*, *hlyA*, *iucD* e *cvaC*, enquanto *ibeA* foi mais frequente no sorogrupo O25. Sete cepas (37%) apresentaram alguma resistência aos antimicrobianos, sendo cinco delas multirresistentes. A combinação de variados FV com resistência a antibióticos pode possibilitar a seleção de cepas com alto poder de patogenicidade. O fato dessas cepas serem de sorogrupos classicamente envolvidos em doenças humanas, é indicativo da importância desses patógenos isolados de animais, para a Saúde Pública. A detecção de multirresistência em isolado de ave selvagem com alto potencial patogênico, sugere que esses patógenos podem ter impacto na Saúde Ambiental.

Palavras-chaves: *Escherichia coli*, ExPEC, APEC, UPEC, sorogrupos O2 e O25, resistência a antibióticos.

Abstract

Escherichia coli is a commensal bacterium of the intestine of warm-blooded animals. Along the evolutionary scale, however, several clones have acquired specific virulence factors (VF) becoming pathogenic for humans and animals. The pathogenic *E. coli* can be divided into two distinct groups: *Diarrheagenic E. coli* and the ones that cause extra intestinal diseases - generically called ExPEC. Once the ExPECs have been considered important pathogens related to Public Health, as well as to animal diseases, this essay has the objective of studying the virulence profile and its relation to antibiotic resistance in samples of ExPEC of O2 and O25 serogroups, isolated from urinary infections of cats and dogs, canine piometry and fecal samples from apparently healthy free-living frigates. Thus, samples of *E. coli* were analyzed by PCR to research genes that codify specific FV, which include: genes associated with adhesin expression (*fimH*, *papC*, *papEF*, *sfa*) invasin (*ibeA*), toxins (*cnf1*, *hlyA*), siderophores (*iucD*, *fyuA*) evasin (*traT*), CoLV plasmid (*cvaC*) and pathogenicity island (*malX*). The antimicrobial susceptibility was investigated by international standards. All 19 samples surveyed had varied number of virulence genes, and the O2 strains showed higher virulence genes average (7.5) than the O25 (6.1). All strains were positive for the genes *fimH*, *fyuA* and *malX*, where isolated O2 had higher frequency of genes *pap*, *cnf1*, *hlyA*, *iucD* and *cvaC*, while *ibeA* was more frequent in serogroup O25. Seven strands (37%) presented some resistance to antimicrobials, and five were multi-resistant. The combination of various VF with antibiotic resistance might enable the selection of strains with high pathogenicity. The fact that these strains were from serogroups classically involved in human disease suggests the importance of these isolated animal pathogens to Public Health. Furthermore, the detection of multi-resistance isolated from wild birds with high pathogenic potential, suggests that these pathogens may have an impact on Environmental Health.

Keywords: *Escherichia coli*, ExPEC, APEC, UPEC, O2 and O25 serogroups, antibiotic resistance.

Sumário

1. Introdução	11
2. Revisão de Literatura	13
2.1. Doenças induzidas por ExPEC	16
2.1.1. Infecção do trato urinário	16
2.1.2. Piometra	16
2.1.3. Colibacilose aviária	17
2.1.4. Pneumonia	17
2.1.5. Meningite neonatal.....	18
2.2. Potencial zoonótico das ExPEC.....	18
2.3. Sorogrupos O2 e O25.....	19
3. Objetivo	20
4. Materiais e Métodos	21
4.1. Amostras	21
4.2. Pesquisa de fatores de virulência	21
4.3. Eletroforese.....	22
4.4. Teste de sensibilidade a antimicrobianos	22
5. Resultados	26
6. Discussão	30
7. Conclusões	36
8. Referências Bibliográficas.....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1 Resultados referentes à pesquisa de genes de virulência e resistência aos antibióticos em 19 cepas de *E. coli* isoladas de urina, pus e conteúdo cloacal, respectivamente, de cães e gatos com ITU, cadelas com piometra e aves de vida livre.....17

Tabela 2 Relação entre a origem das amostras e o percentual de genes de virulência encontrados em cepas de *E. coli* isoladas de urina, pus e conteúdo cloacal, respectivamente, de cães e gatos com ITU, cadelas com piometra e aves de vida livre.....18

Tabela 3 Relação entre os sorogrupos e o percentual de genes de virulência encontrados em cepas de *E. coli* isoladas de urina, pus e conteúdo cloacal, respectivamente, de cães e gatos com ITU, cadelas com piometra e aves de vida livre.....18

Lista de Quadros

Quadro 1 Relação das cepas de *E. coli* estudadas segundo o sorotipo, o grupo filogenético e a origem animal.....12

Quadro 2 Descrição das amostras padrão (controles) utilizadas na pesquisa dos genes de virulência de *E. coli*.....13

Quadro 3 Genes, sequencia dos iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados e referências relacionadas às reações de PCR realizadas.....14

Lista de Abreviaturas e Siglas

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CoIV – colicina V

DAEC – diffusely adherent *Escherichia coli*

EAEC – enteroaggregative *Escherichia coli*

E. coli – *Escherichia coli*

EHEC – enterohaemorrhagic *Escherichia coli*

EIEC – enteroinvasive *Escherichia coli*

EPEC – enteropathogenic *Escherichia coli*

ESBL – bactéria produtora de β -lactamase de amplo espectro

ETEC – enterotoxigenic *Escherichia coli*

ExPEC – extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*

FV – fator de virulência

ITU – infecção do trato urinário

IV – índice de virulência

PAI – ilha de patogenicidade

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

1. Introdução

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, que coloniza o trato gastrointestinal poucas horas após o nascimento, com cepas provenientes da mãe ou adquiridas do meio ambiente. A *Escherichia coli* e seus hospedeiros coexistem com benefícios mútuos, e essas cepas comensais raramente causam doenças – exceto em hospedeiros imunocomprometidos ou que tenham lesões no epitélio gastrointestinal (KAPER *et al.*, 2004).

Certas amostras de *E. coli*, têm sido implicadas numa ampla gama de doenças, que afetam tanto homens quanto animais no mundo todo. As doenças são ocasionadas por clones de *E. coli* altamente adaptados, que adquiriram fatores de virulência (FV) específicos, conferindo aumento na habilidade de adaptação a novos nichos e permitindo causar um amplo espectro de doenças (KAPER *et al.*, 2004).

Fatores de virulência podem ser definidos como estruturas ou substâncias produzidas por determinada bactéria e que possibilitem a esta ocasionar doença. Esses FV são codificados geneticamente e, devido às características de recombinação genética das bactérias, podem ser mobilizados para diferentes cepas, criando novas combinações. Apenas as combinações mais bem sucedidas dos FV tornaram-se patótipos específicos de *E. coli*, e são capazes de causar doenças em indivíduos saudáveis (KAPER *et al.*, 2004).

O ganho e a perda de elementos genéticos móveis têm um papel fundamental na formação do genoma da bactéria patogênica. A transferência horizontal de genes é um importante mecanismo, pelo qual rapidamente se disseminam novas características nos organismos receptores (SHAMES *et al.*, 2009). Grandes aglomerados de genes de virulência, chamados ilhas de patogenicidade (PAIs), podem ser encontrados em plasmídios ou integrados no cromossomo da bactéria patogênica, porém, não são encontrados em bactérias não-patogênicas. Características que são adquiridas por transferência horizontal de genes podem permitir que a bactéria receptora colonize um novo nicho e, assim, selecionar as variantes que possam sobreviver às pressões seletivas do ambiente (CROXEN e FINLAY, 2010). Esse fenômeno, por promover variabilidade genética, tem papel importante na evolução microbiana (HENTSCHEL e HACKER, 2001).

Devido a esses mecanismos, as cepas de *E. coli* podem ser classificadas de acordo com critérios clínicos e genéticos dentro de três grupos: cepas comensais, patogênicas intestinais ou diarreiogênicas e patogênicas extra-intestinais - ExPEC (RUSSO E JOHNSON, 2000).

Considerando-se as *E. coli* diarreiogênicas, seis patótipos são referidos devido à combinação dos seus FVs – EPEC (*Enteropathogenic E. coli*), EHEC (*Enterohaemorrhagic E. coli*), ETEC (*Enterotoxigenic E. coli*), EIEC (*Enteroinvasive E. coli*), EAEC (*Enteropathogenic E. coli*) e DAEC (*Diffusely adherent E. coli*) (CROXEN e FINLAY, 2010).

As ExPEC expressam uma variedade de genes associados à virulência ao invés de um mecanismo de virulência comum (BRZUSKIEWICZ *et al.*, 2006) e serão o tema da revisão de literatura a seguir.

2. Revisão de Literatura

Às ExPEC se atribui um grupo heterogêneo de doenças humanas como infecções do trato urinário (ITU), meningites, pneumonias, infecções sistêmicas, entre outras (RUSSO e JOHNSON, 2000; JOHNSON e RUSSO, 2002).

Esse grupo de *E.coli* patogênica leva a doenças com elevada morbidade e mortalidade, tendo grande impacto na Saúde Pública, com um custo econômico de vários bilhões de dólares anualmente (RUSSO e JOHNSON, 2003).

Nos animais, as ExPEC são, principalmente, relacionadas às doenças sistêmicas em aves, infecções do trato urinário de cães e gatos, piometras e pneumonias (YURI *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2003; JOHNSON *et al.*, 2003; MOULIN-SCHOULEUR *et al.*, 2007; SURA *et al.*, 2007).

Com relação à saúde animal, além dos prejuízos ocasionados às criações, discute-se a importância dos animais como fonte de infecção para as doenças humanas, uma vez que tem sido demonstrado o potencial zoonótico das ExPEC de origem animal (JOHNSON *et al.*, 2001; EWERS *et al.*, 2007; PEIRANO e PITOUT, 2010; TIVENDALE *et al.*, 2010).

A designação desse grupo bacteriano pelo acrônimo mais generalista de ExPEC foi proposta por Russo e Johnson (2000), pois cepas isoladas de infecções do trato urinário (UPEC – *uropathogenic E. coli*), septicemias (SEPEC – *sepsis-associated E. coli*), meningite neonatal (NEMEC – *neonatal meningitis-associated E. coli*) e doença aviária (APEC – *avian pathogenic E. coli*), apresentavam características de virulência semelhantes e, algumas vezes, indistinguíveis entre si.

A aquisição e/ou eliminação de elementos genéticos, ao longo da escala evolutiva das *E. coli*, levou a “construção” de diferentes clones. Esses clones se derivaram, portanto, de grupos filogenéticos distintos. Clermont e colaboradores (2000), através da pesquisa de dois genes (*chuA* e *yjaA*) e do fragmento TspE4.C2 possibilitaram que, através da reação de PCR, cepas de *E. coli* fossem classificadas em quatro grupos filogenéticos principais: A, B1, B2 e D.

Geralmente, as cepas de *E. coli* comensais humanas derivam dos grupos filogenéticos A e B1, e normalmente não se encontram nessas cepas os

determinantes especializados em virulência que são encontrados nas cepas patogênicas (PICARD *et al.*, 1999; RUSSO E JOHNSON, 2000). A maior parte das cepas de ExPEC é encontrada nos grupos filogenéticos B2 e D, estas possuem variados genes de virulência os quais permitem a indução de infecções extraintestinais. A maioria dos FV presentes nas cepas de ExPEC é diferente daqueles encontrados nas cepas patogênicas intestinais (PICARD *et al.*, 1999; RUSSO e JOHNSON, 2000; 2003).

Dentre os FV associados às amostras de ExPEC, encontram-se adesinas como a fímbria do tipo 1, cujo marcador é o gene *fimH*; fímbria P associada à pielonefrite (*pap*) e a fímbria S (*sfa*), entre outras. As fímbrias possuem um importante papel na patogênese bacteriana por possibilitarem a interação inicial entre a bactéria e seus hospedeiros. São ainda de grande relevância na formação de biofilmes, que são comunidades de bactérias aderidas mutuamente e/ou a uma superfície, envolvidas em uma matriz de exopolímeros (polissacarídeos) (JOHNSON e RUSSO, 2005; MELICAM *et al.*, 2011).

Os biofilmes são associados a diversos problemas de saúde e prejuízos econômicos (COSTERTON *et al.*, 1999). O modo de formação do biofilme tem atraído particular atenção, porque se acredita que muitas infecções bacterianas crônicas e persistentes estão relacionadas a esse modo. As infecções ocasionadas por bactérias, que formam biofilme, são mais complicadas porque unidas, essas bactérias suportam mais as respostas imunes do hospedeiro e, também, tornam-se até 1000 vezes mais resistentes aos antibióticos (COSTERTON *et al.*, 1995; 1999).

Hancock (2007) estudou o papel de um amplo espectro de fatores que demonstram influenciar a formação dos biofilmes em *E. coli*, como a fímbria tipo 1, os flagelos e várias estruturas polissacarídeas. Suas observações revelaram que as cepas causadoras de bacteriúria assintomática parecem ser melhores formadoras de biofilme do que as cepas de UPEC (*Uropathogenic E. coli*), sugerindo que a colonização do trato urinário por um biofilme de *E. coli* não é somente um mecanismo de virulência, é também uma característica de sobrevivência.

Com relação às toxinas, duas se destacam a α -hemolisina (*hly*) e o fator citotóxico necrotizante I (*cnf1*). Há grande correlação entre essas duas toxinas, uma vez que

são codificadas em uma mesma ilha de patogenicidade de *E. coli* (DOBRINDT *et al.*, 2002).

CNF1 apresenta reconhecido papel na alteração do citoesqueleto de células do uroepitélio e consequente auxílio na penetração e distribuição bacteriana nessas células (BOWER *et al.*, 2005).

A α -hemolisina é uma proteína capaz de lisar glóbulos vermelhos, devido à formação de poros na membrana das hemácias, o que leva a sua ruptura e como consequência a liberação de ferro (YURI *et al.*, 1998)

Vários sideróforos são importantes na obtenção de ferro dos tecidos do hospedeiro, entre eles estão os que possuem os genes marcadores *fyuA* (yersiniabactina) e *iucD* (aerobactina). Essas proteínas, que variam na sua afinidade ao ferro, são importantes na obtenção desse metal em tecidos onde esse não se encontra na forma livre (SCHUBERT *et al.*, 2002).

Proteínas que possibilitam a invasão ou evasão do sistema imune são também associadas às doenças extraintestinais. A proteína de membrana externa traT (associada ao gene *traT*) é uma evasina relacionada com a resistência ao soro. A invasão do endotélio cerebral é ocasionada por uma invasina cujo marcador é o gene *ibeA* (JOHNSON e RUSSO, 2005).

Os genes *cvaC* e *malX* são, respectivamente, importantes marcadores plasmidial e de ilha de patogenicidade cromossomal e, quando presentes, dão indícios do potencial patogênico da cepa como ExPEC. Entre os plasmídios, o ColV, cujo marcador é o gene acima referido, é um exemplo, pois desde a década de 1970 é associado à virulência (SMITH e HUGGINS, 1976; JOHNSON e NOLAN, 2009).

Vários são os marcadores associados às ilhas de patogenicidade das ExPEC. O gene *malX* é o marcador da PAI I da cepa urosepticêmica CFT073, amostra reconhecida pela grande quantidade de PAIs que alberga (JOHNSON e RUSSO, 2005).

São reconhecidos pela literatura vários sorogrupos que concentram cepas humanas e animais envolvidas com doença extraintestinal, são eles: O2, O4, O6, O11, O25, O75 e O102. Alguns desses apresentam, inclusive, uma forte relação com

resistência a antibióticos (JOHNSON *et al.*, 1994; YURI *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 2010; VINCENT *et al.*, 2010).

2.1. Doenças induzidas por ExPEC

2.1.1. Infecção do trato urinário

Dentre as ExPEC, as cepas de UPEC são as que comumente estão relacionadas com doenças em seres humanos e animais de companhia. Essas bactérias são os principais agentes das infecções do trato urinário (ITUs); na população humana são responsáveis por substanciais custos médicos e altas taxas de morbidade no mundo todo (YURI *et al.*, 1998; FOXMAN, 2003).

O trato urinário é normalmente um ambiente estéril, mantendo-se livre de micro-organismos pelo fluxo da urina e pela presença de células do sistema imune, porém, as ITUs estão entre as doenças infecciosas mais comuns no mundo todo (MUHLDOERFER *et al.*, 2001). São causadas, geralmente, por bactérias do reto que ascendem e colonizam o trato urinário (OSBORNE, 1992).

Cerca de 95% dos casos de ITU são infecções na bexiga, que recebem o nome de cistite. Caracterizam-se por sensação de ardência ao urinar, micção frequente e incompleta, e dor suprapúbica (MUHLDOERFER *et al.*, 2001). Quando a infecção ascende para os rins (pielonefrite) torna-se mais grave, podendo também causar calafrios, febre alta, náusea, dores nos músculos e articulações. Se não tratada a pielonefrite pode evoluir para falência renal, bacteremia e sepse (MEHNERT-KAY, 2005).

2.1.2. Piometra

Piometra ou endometrite purulenta crônica é uma doença que afeta, principalmente, cadelas na fase adulta (HARDY e OSBORNE, 1974; EGENVALL *et al.*, 2001). Os sintomas comuns são corrimento purulento vaginal e dor abdominal, além de outros como letargia, depressão, anorexia, poliúria, polidipsia e vômitos (HARDY e OSBORNE, 1974). A infecção que começa na cavidade abdominal pode evoluir rapidamente para uma septicemia. A infecção bacteriana é secundária a uma série de alterações hormonais, mas determinante para a gravidade da doença (CHRISTIANSEN, 1984). As bactérias mais prevalentes na piometra são as

ExPECs, existindo evidências que cepas oriundas do intestino ascendem para o trato urinário e útero (CHEN *et al.*, 2003; SANTOS FILHO, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2009)

2.1.3. Colibacilose aviária

São denominadas APEC cepas de ExPEC que causam infecções em aves. Estas se iniciam com infecções respiratórias que podem evoluir para septicemia (KAPER *et al.*, 2004).

As infecções por cepas de APEC são causa de significativa morbidade e mortalidade, além de causarem grandes custos para a indústria aviária. Esse patógeno entra pelo trato respiratório e coloniza os sacos aéreos das aves, então, a aerossaculite é seguida por infecções extraintestinais que incluem septicemia, pneumonia, pericardite, peritonite e morte (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999).

As cepas de APEC podem ser encontradas no trato gastrointestinal das aves sadias, e, embora confinadas ao sistema gastrointestinal, podem causar infecções extraintestinais em situações em que há o rompimento do equilíbrio da relação parasita-hospedeiro, como é o caso de situações que levam o hospedeiro a imunossupressão (NATARO e KAPER, 1998).

2.1.4. Pneumonia

O risco de desenvolver pneumonia aumenta com a idade, uma causa muito comum de morte entre os idosos. Bactérias Gram-negativas são a causa mais frequente de pneumonias graves (MUDER, 1998).

Nos últimos anos, há relatos de ExPEC como causa de pneumonia em diversas espécies animais (CARVALLO *et al.*, 2010). Vários estudos mostram que isolados de ExPEC oriundos de infecções em homens e em cães são indistinguíveis (JOHNSON *et al.*, 2001).

Carvalho e colaboradores (2010) descreveram um caso fatal de pneumonia num filhote de tigre (*Panthera tigris*) também associada com ExPEC. Este apresentou súbita doença respiratória e morreu poucas horas depois. A cepa isolada do pulmão infectado foi de *E. coli* e continha vários genes de virulência que são associados às ExPEC, são eles *cnf-1*, *sfa*, *fimH*, *hlyD* e *papG*.

Sura *et al.* (2007) isolaram cepas de *E. coli* que causaram pneumonia em gatos e, nessas amostras, encontraram características típicas de ExPEC isoladas de infecções extraintestinais de várias espécies de hospedeiros.

2.1.5. Meningite neonatal

O período neonatal compreende os 28 primeiros dias de vida. A meningite neonatal bacteriana é uma inflamação das membranas do cérebro e da medula espinhal (SMITH *et al.*, 2007). Nos Estados Unidos, mais que 50% dos casos de meningite neonatal foram causadas por cepas de ExPEC (PONG e BRADLEY, 1999).

Muitos dos genes de virulência associados com cepas de ExPEC causadoras de meningite neonatal estão presentes em PAIs, como os genes envolvidos na facilitação da penetração na barreira hematoencefálica, *sfa*, *ibeA* e *cnf1* (BONACORSI *et al.*, 2003).

2.2. Potencial zoonótico das ExPEC

O conhecimento das características de virulência das cepas de *E. coli* que causam infecções em homens e animais aumentou consideravelmente nos últimos anos (KAPER *et al.*, 2004).

Vários trabalhos indicam fatores de virulência comuns em cepas de isolados de infecções de homens e animais, o que poderia sugerir que as cepas de ExPEC são patógenos zoonóticos (SMITH *et al.*, 2007).

Tivendale *et al.* (2010) isolaram cepas de ExPEC muito semelhantes entre si, apesar de serem oriundas de diferentes hospedeiros e manifestações clínicas, o que reforçou estudos anteriores sobre o potencial zoonótico das ExPEC. Além disso, confirmaram o potencial zoonótico através de uma cepa de APEC que causou meningite num modelo murino de meningite neonatal.

2.3. Sorogrupos O2 e O25

O sorogrupo O2 esta amplamente referido na literatura como um dos principais envolvidos em ITU, meningite neonatal e septicemia humana (SCHAEFFER, 1983; MOKADY *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2007). É, também, causa frequente de ITU e piometra em animais (JOHNSON, 1991; YURI *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 2007). Além disso, esse sorogrupo figura entre os mais prevalentes em doença aviária, sendo encontrado em diferentes regiões geográficas (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999; MOULIN-SCHOULER *et al.*, 2007).

O sorogrupo O25, embora historicamente relacionado às *E. coli* enterotoxigênicas, apresenta cepas de ExPEC, com destaque especial para um clone (ST131- O25:H4) catalogado na última década como importante agente de infecção urinária e bacteremia, caracterizado como produtor de β -lactamases de amplo espectro e distribuído em diversos continentes (PEIRANO e PITOUT, 2010).

Em estudos realizados, foram isoladas cepas de ExPEC de cães e gatos com ITU (OSUGUI, 2008), cadelas com piometra (SANTOS FILHO, 2008) e de fragatas (*Fregata magnificens*) de vida livre aparentemente sadias (SAVIOLLI, 2010) dos sorogrupos O2 e O25.

3. Objetivo

É objetivo do presente trabalho o estudo do perfil de virulência, e a relação deste com a resistência a antibióticos em amostras de ExPEC dos sorogrupos O2 e O25 isoladas de infecções urinárias de cães e gatos, piometra canina e amostras cloacais de fragatas de vida livre.

4. Materiais e Métodos

4.1. Amostras

Foram utilizadas amostras de *E. coli* pertencentes aos sorogrupos O2 e O25, isoladas em trabalhos realizados anteriormente. Foram estudados quatro isolados de cloaca de fragatas de vida livre, aparentemente saudáveis, cinco isolados de pus de cadelas com piometra, e 10 isolados de urina de cães e gatos com infecção no trato urinário (ITU), somando um total de 19 amostras. A discriminação das amostras encontra-se no quadro 1.

4.2. Pesquisa de fatores de virulência

As amostras de *E. coli* foram analisadas por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) para pesquisar genes que codificam FV específicos. Essa pesquisa foi feita utilizando-se os iniciadores para os genes associados à expressão de adesinas (*fimH*; *papC* e *papEF*; *sfa*), invasina (*ibeA*), toxinas (*cnf1*; *hlyA*), sideróforos (*iucD* e *fyuA*), evasina (*traT*), plasmídeo ColV (*cvaC*) e ilha de patogenicidade (*malX*).

No quadro 2 encontram-se as descrições das amostras padrão (controles positivos e negativos) utilizadas na pesquisa dos genes de virulência, e a descrição dos genes pesquisados está no quadro 3.

A pesquisa dos genes que codificam os fatores de virulência foi realizada em reações de 50 µL contendo, para cada reação: 5 µL de lisado da amostra (alíquota de cultura bacteriana colocada em fervura por 10 minutos); 1,5 µL de MgCl₂; 1,0 µL de dNTP; 1,0 µL de cada um dos iniciadores na concentração de 0,4 µM; 0,1 µL de *Taq* DNA polimerase (Fermentas¹); 5 µL de *Taq* Buffer com HCl (100 mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25 °C, 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40^{TM2}) e 35,4 µL de água mili-Q estéril. As reações foram submetidas ao ciclo de amplificação, no termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*TM, e aquecidas a 94 °C por 10 minutos, depois, 30 ciclos de um minuto cada, desnaturação a 94 °C, anelamento a 64 °C e extensão a 72 °C, além de um ciclo de extensão final de 10 minutos.

¹ Fermentas, Inc., Maryland, EUA

² Trademark: Shell Chemical Co.

Também, no quadro 3, encontram-se descritas as sequências, tamanho do produto amplificado e referências de cada um dos iniciadores utilizados.

4.3. Eletroforese

Após a reação de PCR, 4µl de amostra foram homogeneizados com 1µl do corante *Blue Juice* (azul de Bromofenol) e, então, adicionada ao gel de Agarose a 2% (Bio Basic³), para corrida em cuba de eletroforese a 100 W, por 45 minutos. Após a corrida, o gel foi colocado em solução de brometo de etídio⁴, por 10-15 minutos, e depois observado em transiluminador UV, e fotografado pelo sistema EDAS *Kodak*TM.

4.4. Teste de sensibilidade a antimicrobianos

O antibiograma foi realizado seguindo os padrões do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008a e 2008b). O controle de qualidade do teste utilizou a cepa padrão de *E. coli* ATCC 25922, segundo o preconizado pelo mesmo instituto.

Foram usados os seguintes princípios ativos e suas respectivas concentrações: ampicilina (AMP 10mg), amoxicilina (AMO 10mg), cefalexina (CFE 30mg), cefoxitina (CFO 30mg), cefotaxima (CTX 30mg), ceftiofur (CTF 30mg), estreptomicina (EST 10mg), neomicina B (NEO 30mg), gentamicina (GEN 10mg), amicacina (AMI 30mg), ciprofloxacino (CIP 5mg), norfloxacino (NOR 10mg), enrofloxacino (ENO 5mg), tetraciclina (TET 30mg), cloranfenicol (CLO 30mg), polimixina B (POL 300UI), cotrimoxazol (SUT 25mg), nitrofurantoína (NIT 300mg).

³ Bio Basic, Inc., Ontario, Canada

⁴ Invitrogen Corporation, Carlsbad, EUA

Quadro 1: Relação das cepas de *E. coli* estudadas segundo o sorotipo, o grupo filogenético e a origem animal.

Amostra	Grupo Filogenético	Sorotipo	Origem
01	B2	O2:H4	Urina ITU ¹ / gato
02	B2	O2:H8	Urina ITU ¹ / gato
03	B2	O2:H6	Urina ITU ¹ / cão
04	B2	O2:H31	Urina ITU ¹ / cão
05	B2	O2:HNT	Urina ITU ¹ / cão
06	D	O2:HNT	Urina ITU ¹ / cão
07	B2	O2:H6	Urina/ Piometra cadela
08	B2	O2:H6	Pus/ Piometra cadela
09	B2	O2:H2	Pus/ Piometra cadela
10	B2	O2:H7	Cloaca/ Ave de vida livre
11	B2	O25:H11	Urina ITU ¹ / cão
12	B2	O25:HNT	Urina ITU ¹ / cão
13	B2	O25:H4	Urina/ Piometra cadela
14	B2	O25:H4	Pus/ Piometra cadela
15	B2	O25:H4	Pus/ Piometra cadela
16	B2	O25:H4	Pus/ Piometra cadela
17	B2	O25:H4	Cloaca/ Ave de vida livre
18	B2	O25:H4	Cloaca/ Ave de vida livre
19	D	O25:H4	Cloaca/ Ave de vida livre

1. ITU – infecção de trato urinário

Quadro 2: Descrição das amostras padrão (controles) utilizadas na pesquisa dos genes de virulência de *E. coli*.

Amostra	Controle	Característica	Sorotipo	Origem
K12c600		controle negativo GF A	não fornecido	Silveira, W. D., Brasil
JJ055		controle negativo derivada de K12, GF A	não fornecido	Johnson, J. R., EUA isolado fecal humano de paciente saudável
C7		<i>pap+</i> , <i>sfa+</i> , <i>cnf1+</i> , <i>hly+</i>	O18:K1:H7	Yamamoto, S., Japão isolado humano de cistite
C149		<i>afa1+</i> , <i>aer+</i> , <i>hly+</i>	O75:H5	Yamamoto, S., Japão isolado humano de cistite
JJ079		<i>pap+</i> , <i>sfa+</i> , <i>fimH+</i> , <i>hly+</i> , <i>cnf1+</i> , <i>fyuA+</i> , <i>traT+</i> , PAICFT073+, GF B2	O4:K-:H5	Johnson, J. R., EUA isolado humano de pielonefrite
BUTI 3-1-4		<i>sfa+</i> , <i>hly+</i> , <i>cnf1+</i> , <i>fyuA+</i> , <i>traT+</i> <i>ibeA+</i> , PAICFT073+	O18ac:K1:H7	Johnson, J. R., EUA isolado humano de urosépsis
BUTI 1-7-6		<i>fimH+</i> , <i>fyuA+</i> , <i>cvaC+</i> , <i>traT+</i>	O9:K34:H-	Johnson, J. R., EUA isolado humano de urosépsis
BUTI 1-5-1		<i>pap+</i> , <i>sfa+</i> , <i>iha+</i> , <i>fimH+</i> , <i>fyuA+</i>	O2:K5:H1	Johnson, J. R., EUA isolado humano de urosépsis

Quadro 3: Genes, sequência dos iniciadores, tamanhos dos fragmentos amplificados e referências relacionadas às reações de PCR realizadas.

Gene	Marcador	Iniciador	Sequência	Posição	Tamanho (pb ¹)	Ref. ²
Adesinas	<i>fimH</i>	fimbria do tipo 1	5' TGCAGAACGGATAAGCCGTGG 3' 5' GCAGTCACCTGCCCTCCGTA 3'	1814-1839 2256-2278	508	e e
	<i>papC</i>	fimbria P	5' GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG 3' 5' ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA 3'	(papC) (papC)	328	a a
	<i>papEF</i>	fimbria P	5' GCAACAGCAACGCTGGTGCATCAT 3' 5' AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA 3'	490-514 229-205	336	c c
	<i>sfa</i>	fimbria S	5' CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC 3' 5' CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA 3'	(sfaD) (sfa E)	410	a a
Invasiva	<i>ibeA</i>	"invasion of brain endothelial cells"	5' AGG CAG GTG TGC GCC GCG TAC 3' 5' TGG TGC TCC GGC AAA CCA TGC 3'	261-281 419-439	171	b e
Toxinas	<i>cnf1</i>	fator citotóxico necrotizante I	5' AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG 3' 5' CATTGAGAGTCCTGCCCTCATTAAT 3'	794-817 1291-1267	498	c c
	<i>hlyA</i>	α -hemolisina	5' AACAAAGGATAAGCACTGTTCTGGCR 3' 5' ACCATATAAGCGGTCAATCCCCTCA 3'	1101-1125 2277-2253	1177	c c
Sideróforos	<i>iucD</i>	aerobactina	5' TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT 3' 5' AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG 3'	143-167 744-720	602	c c
	<i>fyuA</i>	yersiniabactina	5' TGA TTA ACC CCG CGA CGG GAA 3' 5' CGC AGT AGG CAC GAT GTT GTA 3'	775-795 1539-1559	787	e d
Evasina	<i>traT</i>	proteína de membrana externa TraT	5' GGT GTG GTG CGA TGA GCA CAG 3' 5' CAC GGT TCA GCC ATC CCT GAG 3'	461-481 728-748	290	e e
Plasmídio	<i>cvaC</i>	plasmídio ColV	5' CAC ACA CAA ACG GGA GCT GTT 3' 5' CTT CCC GCA GCA TAG TTC CAT 3'	23-43 679-699	679	e e
PAI	<i>maX</i>	PAI I _{ColV} 73	5' GGA CAT CCT GTT ACA GCG CGC A 3' 5' TCG CCA CCA ATC ACA GCC GAA C 3'	1021-1042 1921-1942	925	e e

¹ pb - pares de bases; ² referências: a - Le Bouguenec *et al.*, 1992; b - Huang *et al.*, 1995; c - Yamamoto *et al.*, 1995; d - Schubert *et al.*, 1998; e - Johnson e Stell, 2000.

5. Resultados

Tanto as amostras do sorogrupo O2 quanto as do sorogrupo O25 demonstraram grande número de genes de virulência, e as amostras pertencentes ao sorogrupo O2 apresentaram maior média (7,5/10) do que as pertencentes ao sorogrupo O25 (6,1/9) (Tabela 1).

Três genes de virulência estiveram presentes em 100% das cepas estudadas, *fimH*, *fyuA* e *malX*, respectivamente, marcadores para a fimbria do tipo 1, para o cluster que codifica o sideróforo yersiniabactina e para a ilha de patogenicidade de *E. coli* urosepticêmica CFT073 (Tabelas 1 e 2).

Em um total de 19 amostras pesquisadas marcadores do *cluster pap*, para a fimbria P e o gene *sfa*, para a fimbria S, foram observados em, respectivamente, oito (42%) e nove (47%) delas. Os marcadores *pap* foram mais prevalentes no sorogrupo O2 (7/10) quando comparados ao sorogrupo O25 (1/9), o gene *sfa* esteve distribuído de forma semelhante nos dois sorogrupos (50% para O2 e 44% para O25) (Tabela 3). Quando se considera a origem das cepas, embora haja um pequeno número de isolados de pus e conteúdo cloacal, verifica-se que genes do *cluster pap* apareceram com mais frequência em isolados de urina (6/10), quando comparado às cepas de piometra (1/5). O gene *sfa* esteve presente em maior proporção em isolados de piometra (4/5) do que de urina (4/10). Ambos os marcadores para essas fímbrias se apresentaram igualmente distribuídos nas cepas de aves (1/4 cada) (Tabela 2).

O gene *ibeA* estava presente em 13 das 19 amostras pesquisadas (68%). Enquanto esse marcador foi identificado em todas as cepas de piometra estudadas, estava presente em, respectivamente, cinco e três dos 10 isolados de ITU e dos quatro de aves (Tabela 2).

Os genes que são marcadores para as toxinas CNF-1 (*cnf-1*) e para α -hemolisina (*hly*) apareceram nas mesmas cinco amostras (amostra três, sete, oito, nove e onze, 26% do total), oriundas de isolados de ITU ou piometra (Tabela 1).

O gene *iucD*, marcador para o sideróforo aerobactina, apareceu em 7 das 19 amostras (37%), e sua presença foi prevalente nas amostras do sorogrupo O2 (50% das cepas, contra 22% no sorogrupo O25). Cinco dos 10 isolados de ITU

apresentaram esse marcador, contra apenas um dos cinco isolados de piometra e dos quatro de aves.

O gene *traT*, que codifica a evasina TraT, estava presente em 14 das 19 amostras (74%), aparecendo em todos os isolados de cloaca de aves de vida livre, e 7/10 e 3/5, respectivamente, das cepas de urina e piometra

O gene *cvaC* (marcador do plasmídeo ColV) foi encontrado em 12 das 19 amostras estudadas (63%), estando igualmente presente em isolados de pus e urina (3/5 e 6/10) e em três das quatro cepas de aves.

Das 19 amostras pesquisadas quanto à sensibilidade aos antibióticos, 12 delas (63%) foram sensíveis a todas as drogas testadas e sete (37%) apresentaram resistência, e as amostras resistentes foram distribuídas igualmente nos dois sorogrupos estudados.

Dentre as cepas que demonstraram alguma resistência, apenas uma apresentou resistência intermediária ao antimicrobiano sulfametoxazol-trimetropim, todas as outras seis foram resistentes a mais de um princípio ativo testado. Excetuando-se a cepa de número 14 que foi resistente a dois dos princípios ativos (estreptomicina e sulfametoxazol-trimetropim), as outras cinco foram multirresistentes. Além dos genes presentes em todas as cepas estudadas (*fimH*, *fyuA* e *malX*), as que apresentaram resistência demonstraram maiores prevalências de *trat* (cinco das seis cepas - 83%), *iucD*, *cvaC* e *ibeA* (quatro das seis cepas - 67%), *pap* e *sfa* em três cepas (50%).

Tabela 1: Resultados referentes à pesquisa de genes de virulência e resistência aos antibióticos em 19 cepas de *E. coli* isoladas de urina, pus e conteúdo cloacal, respectivamente, de cães e gatos com ITU, cadelas com piometra e aves de vida livre.

Amostra	Origem ¹	Sorotipo	Antibiograma ²	Genes de Virulência
01	U	O2:H4	Sensível	<i>fimH, papC, papEF, iucD, fyuA, trat, cvaC, malX.</i>
02	U	O2:H8	Sensível	<i>fimH, papC, papEF, iucD, fyuA, trat, cvaC, malX.</i>
03	U	O2:H6	Sensível	<i>fimH, sfa, ibeA, cnf1, hlyA, fyuA, malX.</i>
04	U	O2:H31	Sensível	<i>fimH, ibeA, fyuA, trat, malX.</i>
05	U	O2:HNT	Resistente AMP/AMO/EST/TET/SUT	<i>fimH, papC, iucD, fyuA, trat, cvaC, malX.</i>
06	U	O2:HNT	Resistente AMP/AMO/EST/TET/SUT	<i>fimH, papC, iucD, fyuA, trat, cvaC, malX.</i>
07	U	O2:H6	Resistência Intermediária SUT	<i>fimH, papC, sfa, ibeA, cnf1, hlyA, fyuA, trat, cvaC, malX.</i>
08	P	O2:H6	Sensível	<i>fimH, papC, papEF, sfa, ibeA, cnf1, hlyA, fyuA, malX.</i>
09	P	O2:H2	Sensível	<i>fimH, sfa, ibeA, cnf1, hlyA, fyuA, cvaC, malX.</i>
10	C	O2:H7	Resistente AMP/AMO/CFE/CFO/CTX/CTF	<i>fimH, papC, papEF, sfa, ibeA, iucD, fyuA, trat, cvaC, malX.</i>
11	U	O25:H11	Sensível	<i>fimH, papC, papEF, sfa, ibeA, cnf1, hlyA, iucD, fyuA, malX.</i>
12	U	O25:HNT	Sensível	<i>fimH, fyuA, trat, cvaC, malX.</i>
13	U	O25:H4	Resistente AMP/AMO/EST/TET/SUT	<i>fimH, sfa, ibeA, fyuA, malX.</i>
14	P	O25:H4	Resistente EST/SUT	<i>fimH, ibeA, iucD, fyuA, trat, malX.</i>
15	P	O25:H4	Resistente AMP/AMO/EST/TET/SUT	<i>fimH, sfa, ibeA, fyuA, trat, cvaC, malX.</i>
16	P	O25:H4	Sensível	<i>fimH, sfa, ibeA, fyuA, trat, cvaC, malX.</i>
17	C	O25:H4	Sensível	<i>fimH, ibeA, fyuA, trat, cvaC, malX.</i>
18	C	O25:H4	Sensível	<i>fimH, ibeA, fyuA, trat, cvaC, malX.</i>
19	C	O25:H4	Sensível	<i>fimH, fyuA, trat, malX.</i>

1. U- urina; P – pus; C – conteúdo cloacal.

2. AMP – ampicilina; AMO – amoxicilina; EST – estreptomicina; TET – tetraciclina; SUT – sulfametoxazol-trimetropim; CFE – cefalexina; CFO – cefoxitina; CTX – cefotaxima.

Tabela 2: Relação entre a origem das amostras e a quantidade de genes de virulência encontrados em cepas de *E. coli* isoladas de urina, pus e conteúdo cloacal, respectivamente, de cães e gatos com ITU, cadelas com piometra e aves de vida livre.

Amostra	<i>fimH</i>	<i>pap</i>	<i>sfa</i>	<i>cnf1</i>	<i>hlyA</i>	<i>iucD</i>	<i>fyuA</i>	<i>ibeA</i>	<i>traT</i>	<i>cvaC</i>	<i>malX</i>
[redacted]	10	6	4	3	3	5	10	5	7	6	10
	5	1	4	2	2	1	5	5	3	3	5
	4	1	1	-	-	1	4	3	4	3	4

Tabela 3: Relação entre os sorogrupos e o percentual de genes de virulência encontrados em cepas de *E. coli* isoladas de urina, pus e conteúdo cloacal respectivamente, de cães e gatos com ITU, cadelas com piometra e aves de vida livre.

Sorogrupo	<i>fimH</i>	<i>pap</i>	<i>sfa</i>	<i>cnf1</i>	<i>hlyA</i>	<i>iucD</i>	<i>fyuA</i>	<i>ibeA</i>	<i>traT</i>	<i>cvaC</i>	<i>malX</i>
[redacted]	10 (100%)	7 (70%)	5 (50%)	4 (40%)	4 (40%)	5 (50%)	10 (100%)	6 (60%)	7 (70%)	7 (70%)	10 (100%)
	9 (100%)	1 (11%)	4 (44%)	1 (11%)	1 (11%)	2 (22%)	9 (100%)	7 (78%)	7 (78%)	5 (56%)	9 (100%)

6. Discussão

Dentre as infecções ocasionadas por *E. coli*, aquelas relacionadas a sítios extraintestinais caracterizam-se por apresentar grande impacto tanto para a Saúde Pública e Animal, quanto para a criação de animais de produção, devido aos prejuízos ocasionados (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999; RUSSO e JOHNSON, 2003; SIQUEIRA *et al.*, 2009).

Infecção do trato urinário em cães e gatos (OSUGUI, 2008), piometra em cadelas e em grandes felídeos (BAKER e HENDERSEN, 1983; SIQUEIRA *et al.*, 2009), pneumonia em felídeos domésticos e selvagens (SURA *et al.*, 2007; CARVALLO *et al.*, 2010) são alguns exemplos das doenças animais ocasionadas por ExPEC.

Com relação aos animais de produção, um grupo de ExPEC, também denominado APEC (*Avian Pathogenic E. coli*), está entre os patógenos que ocasionam sérios prejuízos à indústria aviária, uma vez que levam a problemas respiratórios e septicemias com altas taxas de morbidade e mortalidade (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999; MOULIN-SCHOULEUR *et al.*, 2007).

O universo de cepas estudadas no presente trabalho de pesquisa foi construído a partir de isolados obtidos de infecções extraintestinais em animais, como ITU em cães e gatos e piometra em cadelas, além de isolados de cloaca de fragatas de vida livre, aparentemente saudáveis. Essas cepas apresentavam em comum o fato de pertencerem a dois sorogrupos clássicos de ExPEC humana (CORTÉS *et al.*, 2010), O2 e O25, embora isoladas de diferentes espécies e/ou síndrome clínicas.

Neste estudo, foram utilizadas 10 cepas do sorogrupo O2, sendo sete delas isoladas de urina de animais com ITU, duas de pus uterino e uma de cloaca de ave aparentemente saudável, e nove cepas de O25, sete delas sorotipadas como O25:H4, incluindo-se três isolados de cada, urina, pus e conteúdo cloacal.

Em estudo realizado previamente com as cepas avaliadas neste trabalho, verificou-se que ambos os sorogrupos estavam predominantemente associados ao grupo filogenético B2.

O grupo B2 congrega cepas altamente virulentas, uma vez que se observa em isolados desse agrupamento filogenético um elevado número de FV, tendo sido

demonstrado através de epidemiologia molecular que essas cepas estão ligadas a síndromes clínicas mais severas (JOHNSON e RUSSO, 2005).

Calculando-se o “Índice de virulência” (IV) (MOULIN-SCHOULEUR *et al.*, 2007) dos isolados desta pesquisa, através da somatória do total de genes de virulência, dividido pelo número de cepas presentes no sorogrupo, há diferenças entre eles. Embora ambos tenham demonstrado variados genes de virulência, o IV do sorogrupo O2 foi mais elevado (7,5/10), quando comparado ao do sorogrupo O25 (6,1/9). Segundo Mokady *et al.* (2005), a plasticidade genética das ExPEC possibilita que cepas, que ocasionam doenças semelhantes, tenham um conjunto de diferentes fatores de virulência, em variadas combinações, o que lhes possibilita uma maior adaptação a diferentes hospedeiros e nichos teciduais. A maior diversidade de genes detectada nas cepas O2 deste estudo, poderia ser indicativa de uma maior capacidade de virulência dessas, quando comparadas às cepas do sorogrupo O25.

Considerando-se a patogênese das infecções por ExPEC, o passo inicial da interação parasita-hospedeiro é a adesão da bactéria às células hospedeiras. As ExPEC possuem fatores de aderência específicos que lhes permitem colonizar diferentes sítios anatômicos (KAPER *et al.*, 2004). Dentre as fímbrias que possibilitam tal interação encontram-se as fímbrias do tipo 1. O gene que codifica a adesina FimH foi encontrado em 100% das amostras aqui estudadas. Além de ser frequentemente associado a isolados de pacientes com cistite (JOHNSON e STELL, 2000), essa fímbria é também responsável pela adesão da bactéria à traquéia de aves com colisepticemia (VANDEMAELE *et al.*, 2003). Existem evidências da participação desse FV nos processos de invasão celular no epitélio vesical, uma vez que essa adesina, interagindo com receptores da membrana do hospedeiro, desencadearia vários sinais, entre eles o rearranjo do citoesqueleto da célula eucariótica que culminaria com a internalização da bactéria (MULVEY *et al.*, 2000; BOWER *et al.*, 2005).

À semelhança do que acontece nas infecções em mamíferos, em que a fímbria P é expressa em doenças mais graves (pielonefrites/bacteremias), em aves com colisepticemia esta é expressa em estágios mais tardios da doença, participando da colonização de órgãos internos (JOHNSON, 1991; VANDEMAELE *et al.*, 2003), sendo um importante indicador de potencial patogênico. O *cluster pap* foi verificado em 42% das cepas pesquisadas, e apareceu com maior frequência nos isolados do

sorogrupo O2 (7/10) do que nos do sorogrupo O25 (1/9). Apesar do número pequeno de cepas isoladas de pus, quando comparadas com urina, aventase que esses resultados podem não ter relação direta com o sorogrupo, mas com a origem da amostra, uma vez que sete das dez cepas O2 eram provenientes de urina e esse marcador esteve presente em maiores proporções em isolados de urina quando comparado às de piometra e ao material fecal de aves. O encontro de marcador para a fímbria P em isolados de urina pode indicar que, conquanto essas cepas estivessem relacionadas à cistite, poderiam ocasionar síndromes mais severas, uma vez que estudos de epidemiologia molecular demonstram a maior prevalência dessa fímbria em isolados de pielonefrites e bacteremias (JOHNSON e RUSSO, 2005).

Em contrapartida, o gene *sfa* foi observado em 47% das amostras estudadas, estando em maior proporção nos isolados de piometra do que de urina e cepas aviárias. O marcador da fímbria S é fortemente associado à sepse e meningite humana (JOHNSON, 1991), além de ser um marcador frequente em isolados de piometra (CHEN *et al.*, 2003; SANTOS FILHO, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2009). Para aves, embora menos prevalente que outros marcadores, mostra-se associado às cepas septicêmicas e pouco às amostras fecais de aves sadias (GHANBARPOUR *et al.*, 2011).

O gene *ibeA*, marcador de uma proteína que facilita a invasão das células do endotélio cerebral, é detectado com significância em isolados de meningite neonatal (HUANG *et al.*, 1995) além de cepas provenientes de aves colisepticêmicas e foi encontrado em 68% das amostras estudadas no trabalho em discussão. É interessante ressaltar que esteve presente em todos os isolados de piometra e em apenas metade (5/10) dos isolados de urina. Sabendo-se que a piometra se constitui em doença grave, tendo como consequência bacteremia e morte (SMITH, 2006), tais resultados poderiam ser indicativos de maior potencial patogênico das cepas que foram capazes de ocasionar piometra. Com relação aos isolados aviários, embora em pequeno número, três das quatro cepas, foram *ibeA*+. Estudos de epidemiologia molecular demonstraram a prevalência desse gene em cepas colisepticêmicas aviárias, à semelhança do que ocorre com isolados de meningite neonatal (EWERS *et al.*, 2007), dando pistas tanto do potencial patogênico desses isolados para as aves pesquisadas, quanto do seu potencial zoonótico.

O gene *cnf-1*, que é o marcador para a toxina CNF-1, e o gene *hlyA*, marcador da toxina α -hemolisina, foram observados em 40% das cepas O2 e 11% das O25, e apareceram sempre juntos, nas mesmas cinco amostras, três delas oriundas de urina e duas de piometra. Está bem estabelecida a sua ocorrência em associação na ilha de patogenicidade PAI I da *E. coli* urosepticêmica (DOBRINDT *et al.*, 2002), o que foi constatado no presente estudo, uma vez que todas as cepas *cnf-1+/hlyA+*, apresentaram também o marcador para essa ilha (*malX*). Não houve a ocorrência desses genes, entretanto, nas cepas de origem aviária, dado compatível com a literatura, pois essa associação é pouco frequente em isolados de aves (EWERS *et al.*, 2007).

Sistemas de aquisição de ferro são importantes vantagens de sobrevivência para patógenos que invadem os tecidos. Pela indisponibilidade de ferro livre nesses locais, patógenos como as ExPEC, dependem de sideróforos endógenos para assegurar o processo de infecção. As *E. coli* apresentam alguns sideróforos, entre eles aerobactina e yersiniabactina (SCHUBERT *et al.*, 2002). O gene *iucD* (*iron uptake chelate*), marcador para o sideróforo aerobactina, foi observado em 37% das cepas, com maior frequência no sorogrupo O2, e o gene *fyuA* (*ferric yersiniabactin uptake*), marcador para o sideróforo yersiniabactina, foi encontrado em todos os isolados. Esses resultados demonstram que todas as amostras estudadas tinham, no mínimo, um sistema de captação de ferro. A presença preponderante do marcador *fyuA* pode ser explicado pelo fato do sideróforo yersiniabactina apresentar maior afinidade ao Fe^{3+} que o aerobactina, o que faz com que cepas com esse FV tenham vantagens em processos invasivos (SCHUBERT *et al.*, 2002).

O gene *traT*, marcador da evasina TraT, que é uma lipoproteína de membrana externa que confere resistência ao soro (SUKUPOLVI e O'CONNOR, 1990), foi encontrado, com elevada frequência nos isolados e distribuído de maneira semelhante entre os dois sorogrupos. O produto desse gene, presente no plasmídeo ColV, previne a deposição do complexo de ataque à membrana do complemento e antagoniza a deposição de C3 (AGÜERO *et al.*, 1984). No presente estudo, houve associação do marcador para o plasmídeo e o gene *traT* em 73% das cepas *traT+*.

O gene *cvaC*, que é o marcador do plasmídeo ColV, responsável pela produção de colicina V (GILSON *et al.*, 1987) foi observado em 12 das 19 amostras pesquisadas. Esse plasmídeo transmissível foi caracterizado como capaz de conferir virulência às

cepas que o portam, graças à presença de outros genes associados, como o referido acima (WALTERS e CROSA, 1991).

A presença de ilha de patogenicidade nas amostras foi pesquisada através do gene marcador *malX*, que está presente na PAI I CFT073, protótipo de cepa urosepticêmica humana (JOHNSON e STELL, 2000). Neste estudo, esse gene foi encontrado em 100% das amostras pesquisadas, independentemente da origem do isolado. A detecção dessa ilha e seus genes associados em isolados de infecções urinárias de cães e gatos tem sido relatada como indicativo do seu potencial zoonótico (JOHNSON *et al.*, 2000). Com relação às aves, Ewers e colaboradores (2007) relacionam a presença do gene à notável troca genética existente entre cepas humanas e de aves, mais uma vez acentuando o seu potencial para ocasionar doenças em ambos, animais e homens.

A grande plasticidade genética das *E. coli* possibilita mecanismos de recombinação que levam ao aparecimento de ilhas de genes cromossomais ou plasmidiais. Além de contribuir para o aumento de virulência, esse fenômeno ainda tem sido relacionado à multirresistência (DAVIES e DAVIES, 2010).

Das 19 amostras aqui pesquisadas, sete apresentaram resistência aos antimicrobianos, e cinco delas foram multirresistentes.

A multirresistência tem sido tratada como um dos importantes desafios para a área da saúde nas últimas décadas, uma vez que esse fenômeno ocorre de maneira mais acelerada do que a descoberta de novas drogas antimicrobianas (ALANIS, 2005).

Todas as cepas multirresistentes apresentaram resistência aos β -lactâmicos ampicilina e amoxicilina. Ambos são bactericidas tanto para bactérias Gram-negativas quanto para Gram-positivas, tendo se mostrado eficazes contra a *E. coli* na década de 1960. Atualmente, há grande porcentagem de cepas resistentes, especialmente aquelas relacionadas a ITU (SMITH *et al.*, 2007). Também tem sido descrita a importância dos animais de produção como fontes de *E. coli* dos sorotipos clássicos humanos (entre eles O2:H6, O2:HNM, O2:H7 e O25:H4) carreadoras de genes que codificam β -lactamases (CORTÉS *et al.*, 2010).

Atualmente, existe uma grande preocupação com as bactérias capazes de produzir β -lactamases de amplo espectro (ESBLs), devido ao fato de apresentarem seus

genes de resistência em grandes plasmídeos que hospedam genes para resistência a outras classes de antibióticos, apresentando multirresistência. As ESBLs são capazes de hidrolisar algumas cefalosporinas, como a cefotaxima (PEIRANO e PITOUT, 2010).

Das 19 amostras submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos, apenas uma delas, oriunda de cloaca de ave de vida livre, apresentou resistência aos antibióticos da classe das cefalosporinas. A relevância desse achado encontra-se no fato de que o encontro de cepa multirresistente em animal selvagem, com pouco ou nenhum contato humano, pode ser sugestivo de que a disseminação de resistência aos antimicrobianos não se limite apenas aos animais de produção, mas atinja também os ambientes naturais.

Não se verificou, entretanto, entre os isolados do sorotipo O25:H4, cepa com perfil de produção de ESBL. O fenótipo, O25:H4/resistente a oximino-cefalosporinas, está relacionado ao clone de *E. coli* ST131, considerado de emergência mundial como causador de infecções comunitárias e hospitalares de grande gravidade, visto a resistência a múltiplos antibióticos (PEIRANO e PITOUT, 2010).

A multirresistência, como referido acima, está relacionada à aquisição de conjuntos de genes que codificam resistência a variados antibióticos. Segundo Johnson e Nolan (2009), a descrição de plasmídeos ColV híbridos caracterizados em isolados de aves que adquiriram resistência a múltiplas drogas, é um fato preocupante, uma vez que o uso de antibióticos facilitaria a seleção de cepas altamente virulentas.

Pode-se verificar no estudo em tela que as cepas que demonstraram multirresistência, apresentaram variados genes de virulência. Considerando-se que os antibióticos são empregados em larga escala no tratamento de animais e, principalmente, como promotores de crescimento nas criações (BOGAARD e STOBBERINGH, 2000), essa combinação de fatores poderia acelerar a seleção de cepas com alto poder de patogenicidade para os seus hospedeiros.

7. Conclusões

- As cepas dos sorogrupos O2 e O25 isoladas de animais de companhia doentes e aves de vida livre sadias apresentaram alto potencial patogênico, visto a variada gama de fatores de virulência demonstrada.
- Cepas desses sorogrupos, classicamente envolvidos em doença humana, isoladas de animais de companhia, que apresentam íntima convivência com o homem, reforçam a importância desses patógenos para a Saúde Pública.
- A associação de uma variedade de marcadores de virulência com a multirresistência em algumas cepas, seria indicativo de seu maior potencial patogênico.
- A caracterização de cepas com potencial de multirresistência e/ou virulência em aves selvagens de vida livre sugere que não só a Saúde Animal e Pública, mas também a Saúde Ambiental deve merecer atenção.

8. Referências Bibliográficas*

AGUERO, M. E.; ARON, L.; DELUCA, A. G.; TIMMIS, K. N.; CABELLO, F. C. A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. **Infect. Immun.**, v. 46, p. 740-746, 1984.

ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Arch. Med. Res.**, v. 36, p. 697-705, 2005.

BAKER, R.; HENDERSON, R. Pyometra in an African lioness. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 183, p. 1314-1320, 1983.

BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 14, p. 327-335, 2000.

BONACORSI, S.; CLERMONT, O.; HOUDOUIN, V.; CORDEVANT, C.; BRAHIMI, N.; MARECAT, A.; TINSLEY, C.; NASSIF, X.; LANGE, M.; BINGEN, E. Molecular analysis and experimental virulence of French and North American *Escherichia coli* neonatal meningitis isolates: identification of a new virulent clone. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 1895-1906, 2003.

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

BRZUSZKIEWICZ, E.; BRUGGEMANN, H.; LIESEGANG, H. How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, p. 12879-12884, 2006.

CARVALLO, F. R.; DEBROY, C.; BAEZA, E.; HINCKLEY, L.; GILBERT, K.; CHOI, S. J.; RISATTI, G.; SMYTH, J. A. Necrotizing pneumonia and pleuritis associated with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a tiger (*Panthera tigris*) cub. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 22, p. 136-140, 2010.

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

CHRISTIANSEN, I. J. **Reproduction in the dog and cat**. São Paulo: Bailliere Trindall. Cap.7, 1984, p. 154-170.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEM, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 4555-4558, 2000.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CLSI - Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard – third edition. CLSI document M31-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008a.

CLSI – Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100-S18 e M100-15. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008b.

CORTÉS, P.; BLANC, V.; MORA, A.; DAHBI, G.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; LÓPEZ, C.; ANDREU, A.; NAVARRO, F.; ALONSO, M. P.; BOU, G.; BLANCO, J.; LLAGOSTERA, M. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p. 2799-2805, 2010.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 49, p. 711-745, 1995.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 26-38, 2010.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 74, p. 417-433, 2010.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Vet. Res.**, v. 30, p. 299-316, 1999.

DOBRINDT, U.; BLUM-OEHLER, G.; NAGY, G.; SCHNEIDER, G.; JOHANN, A.; GOTTSCHALK, G.; HACKER, J. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands PAI I (536) to PAI IV (536) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 6365-6372, 2002.

EGENVALL, A.; HAGMAN, R.; BONNETT, B. N.; HEDHAMMAR, A.; OLSSON, P.; LAGERSTEDT, A. S. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 15, p. 530-538, 2001.

EWERS, C.; ANTÃO, E. M.; DIEHL, I.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L. H. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 184-192, 2007.

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

GHANBARPOUR, R.; SAMI, M.; SALEHI, M.; OUROMIEI, M. Phylogenetic background and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from colisepticemic and healthy broiler chickens in Iran. **Trop. Anim. Health. Prod.**, v. 43, p. 153-157, 2011.

GILSON, L.; MAHANTY, H. K.; KOLTER, R. Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 2466-2470, 1987.

HANCOCK, V. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 267, p. 30-37, 2007.

HARDY, R. M.; OSBORNE, C. A. Canine pyometra: pathophysiology, diagnosis and treatment of uterine and extra-uterine lesions. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 10, p. 245-267, 1974.

HENTSCHEL, U.; HACKER, J. Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. **Microbes Infect.**, v. 3, p. 545-548, 2001.

HUANG, S. H.; WASS, C.; FU, Q.; PRASADARAO, N. V.; STINS, M.; KIM, K. S. *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo: molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 4470-4475, 1995.

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

JOHNSON, J. R.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; GOULLET, P.; PICARD, B.; MOSELEY, S. L.; ROBERTS, P. L.; STAMM, W. E. O, K and H antigens predict virulence factors, carboxylesterase B pattern, antimicrobial resistance, and host compromise among *Escherichia coli* strains causing urosepsis. **J. Infect. Dis.**, v. 169, p. 119-126, 1994.

JOHNSON, J. R.; O'BRYAN, T. T.; LOW, D. A.; LING, G.; DELAVARI, P.; FASCHING, C.; RUSSO, T. A.; CARLINO, U.; STELL, A. L. Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express *papG* allele III. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3327-3336, 2000.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extend virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to pylogeny and host compromise. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 261-72, 2000.

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

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. "Uropathogenic" *E. coli* as agents of diverse in urinary-tract extraintestinal infections. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 859-864, 2002.

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

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 259, p. 383-404, 2005.

JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 73, p. 750-774, 2009.

JOHNSON, J. R.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C.; KUSKOWSKI, M. A.; CASTANHEIRA, M. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of

serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. **Clin. Infect. Dis.**, v. 51, p. 286-294, 2010.

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

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and Specific Detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 1189-1193, 1992.

MEHNERT-KAY, S. A. Diagnosis and management of uncomplicated urinary tract infections. **Am. Fam. Physician.**, v. 72, p. 451-456, 2005.

MELICAN, K.; SANDOVAL, R. M.; KADER, A.; JOSEFSSON, L.; TANNER, G. A.; MOLITORIS, B. A.; RICHTER-DAHLFORS, A. Uropathogenic *Escherichia coli* P and type 1 fimbriae act in synergy in a living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction. **PLoS Pathog.**, v. 7, p. 1-12, 2011.

MOKADY, D.; GOPHNA, U.; RON, E. Z. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 295, p. 455-462, 2005.

MOULIN-SCHOULEUR, M.; REPÉRANT, M.; LAURENT, S.; BRÉE, A.; MIGNON-GRASTEAU, S.; GERMON, P.; RASSCHAERT, D.; SCHOULEUR, C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3366-3376, 2007.

MUDER, R. R. Pneumonia in residents of long-term care facilities: epidemiology, etiology, management, and prevention. **Am. J. Med.**, v. 105, p. 319-330, 1998.

MUHLDOERFER, I.; ZIEBUHR, W.; HACKER, J. *Escherichia coli* in urinary tract infections. In: SUSSMAN, M. **Molecular Microbiology**. London: Academic Press, 2001. p. 1739-1748.

MULVEY, M. A.; SCHILLING, J. D.; MARTINEZ, J. J.; HULTGREN, S. J. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, p. 8829-8835, 2000.

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

OSBORNE, C. A. Recurrent bacterial urinary tract infections in dogs: cause, cure, control. **Vet. News**, v. 14, p. 17-22, 1992.

OSUGUI L. **Pesquisa e Caracterização de Amostras de ExPEC (" Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* ") Isoladas de Infecções do Trato Urinário (ITU) de Cães e Gatos**. São Paulo, 2008. 76p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo.

PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. **Int. J. of Antimicrob. Agents**, v. 35, p. 316-321, 2010.

PICARD, B.; GARCIA, J. S.; GOURIOU, S.; DURIEZ, P.; BRAHIMI, N.; BINGEN, E.; ELION, J.; DENAMUR, E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 546-553, 1999.

PONG, A.; BRADLEY, J. S. Bacterial meningitis and the newborn infant. **Infect. Dis. Clinics North Am.**, v. 13, p. 711-733, 1999.

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

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 449-456, 2003.

SANTOS FILHO, J. C. B. **Pesquisa de bactérias e sua sensibilidade aos antimicrobianos em cães com piometra, com especial interesse na caracterização das *Escherichia coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC).** São Paulo, 2008. 68p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Paulista.

SAVIOLLI, J. Y. **Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E.coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E.coli* aviária patogênica – APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da costa do estado de São Paulo.** São Paulo, 2010. 83p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo.

SCHAEFFER, A. Bladder defense mechanisms against urinary tract infections. **Semin. Urol.**, v. 1, p. 106-113, 1983.

SCHUBERT, S.; RAKIN, A.; KARCH, H.; CARNIEL, E.; HEESEMANN, J. Prevalence of the “high-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **Infect. Immun.**, v. 6, p. 480-485, 1998.

SCHUBERT, S.; PICARD, B.; GOURIOU, S.; HEESEMANN, J.; DENAMUR, E. *Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 5335-5337, 2002.

SHAMES, S. R.; AUWETER, S. D.; FINLAY, B. B. Co-evolution and exploitation of host cell signaling pathways by bacterial pathogens. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 41, p. 380-389, 2009.

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

SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B. Further observations on the association of the colicine V plasmid of *Escherichia coli* with pathogenicity and with survival in the alimentary tract. **J. Gen. Microbiol.**, v. 92, p. 335-350, 1976.

SMITH, F. O. Canine pyometra. **J. Theriolog.**, v. 66, p. 610-612, 2006.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 4, p. 134-163, 2007.

SUKUPOLVI, S.; O'CONNOR, C. D. TraT lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 334-341, 1990.

SURA, R.; VAN KRUININGEN, H. J.; DEB ROY, C.; HINCKLEY, L. S.; GREENBERG, K. J.; GORDON, Z.; FRENCH, R. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*-induced acute necrotizing pneumonia in cats. **Zoonoses Public Health**, v. 54, p. 307-313, 2007.

TIVENDALE, K. A.; LOGUE, C. M.; KARIYAWASAM, S.; JORDAN, D.; HUSSEIN, A.; LI, G.; WANNEMUEHLER, Y.; NOLAN, L. K. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 3412-3419, 2010.

VANDEMAELE, F.; VANDEKERCHOVE, D.; VEREECKEN, M.; DERIJCKE, J.; DHO-MOULIN, M.; GODDEERIS, B. M. Sequence analysis demonstrates the conservation of *fimH* and variability of *fimA* throughout avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Vet. Res.**, v.34, p. 153-163, 2003.

VINCENT, C.; BOERLIN, P.; DAIGNAULT, D.; DOZOIS, C. M.; DUTIL, L.; GALANAKIS, C.; REID-SMITH, R. J.; TELLIER, P. P.; TELLIS, P. A.; ZIEBELL, K.; MANGES, A. R. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 16, p. 88-95, 2010.

WATERS, V. L.; CROSA, J. H. Colicin V virulence plasmids. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 437-450, 1991.

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

YURI, K.; NAKATA, K.; KATAE, H.; TSUKAMATO, T.; HASEGAWA, A. Serotypes and virulence factor of *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 61, p. 37-40, 1998.