



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS E ADESINAS
DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE FEZES DE CANINOS
ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.**

ANNE DAIANNE SOUSA DA SILVA MARQUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF
JULHO/2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS E ADESINAS
DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE FEZES DE CANINOS
ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.**

ANNE DAIANNE SOUSA DA SILVA MARQUES

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a SIMONE PERECMANIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: DM 082/13

BRASÍLIA/DF
JULHO/2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS E ADESINAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE FEZES DE CANINOS ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.

ANNE DAIANNE SOUSA DA SILVA MARQUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL
COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

APROVADA POR:

PROF^a. DR^a. SIMONE PERECMANIS (Universidade de Brasília)
(ORIENTADORA)

PROF^a. DR^a. ANGELA PATRÍCIA SANTANA (Universidade de Brasília)
(EXAMINADORA INTERNA)

PROF^a. DR^a. ADRIANA MORAES DA SILVA (União Pioneira de Integração Social)
(EXAMINADORA EXTERNA)

BRASÍLIA, 19 DE JULHO DE 2013.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MARQUES, A.D.S.S **Detecção de Genes de Enterotoxinas, e Adesinas de *Escherichia coli* Isoladas de Caninos Atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, p 45. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte;

FICHA CATALOGRÁFICA

Marques, Anne Daianne Sousa da Silva.

Detecção de Genes de Enterotoxinas e Adesivas de *E.coli* isoladas Caninos Atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília/Anne Daianne Sousa da Silva Marques. Orientação Simone Perecmanis – Brasília, 2013. p. 45.: Il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1.Cães. 2. *E.coli*. 3. Enterotoxinas. 4. Resistência antimicrobiana. 5. Adesinas I. Perecmanis, S. II.
Titulo

CDD ou CDU

“Ó Profundidade das riquezas, tanto da sabedoria como a ciência de Deus!
Quão insondáveis são os seus juízos e inescrutáveis os seus caminhos!
Pois quem jamais conheceu a mente do Senhor? Ou quem foi o seu conselheiro? Ou quem lhe deu primeiro a Ele para que fosse recompensado?
Porque Dele e por Ele e para Ele são todas as coisas. Gloria, pois a Ele eternamente, Amém”.

Romanos 11: 33-36

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por ter me dado fôlego de vida, a salvação em Cristo Jesus, a inteligência, a família que tenho e os amigos. Toda honra, glória, seja dada ao Seu nome.

Quero agradecer também ao Marcos, companheiro de todas as horas, meu marido, amigo, meu amor que tem me ajudado e me amparado, comprado chocolate nas horas de maior desespero... Obrigada Amor, te amo demais!

À minha família que está no Rio de Janeiro sempre torcendo por mim, minha mãe e fiel amiga Gedalia, meu pai Neurinam que com alegria sempre me apoiou, meus irmãos Josias e Anne Marcelle, meus sobrinhos Artur e Eduardo, que sempre têm um sorriso e uma gracinha pra me fazer sentir mais saudades!

Meu avô Josias e Jarlita pelo apoio incondicional;

À minha avó Celina, e tia Edna;

À tia Concita que permitiu que eu "acampasse" em sua casa;

À dona Maria que cuida do meu cachorro Chulé sem reclamar e sem deixar que eu o traga pra Brasília;

Aos meus amigos praticamente (co-orientadores) de laboratório Hudson e Vinicius que sempre me responderam pacientemente a TODAS as minhas dúvidas e me ajudaram infinitamente na minha caminhada acadêmica desde que eu cheguei em Brasília;

À professora Simone Perecmanis que foi mais que uma orientadora e mesmo tarde da noite estávamos lá, firmes, tentando enxergar as bandas no transluminador; torcendo para que tudo desse certo;

Aos professores, Ângela Patrícia, Adriana Moraes; que aceitaram a participação na Banca;

Ao professore Gino Rocha pelos conselhos no meio do corredor, ter aceitado ser suplente da banca e ainda estou devendo um churrasco...

À Kelly e Iraci no apoio na secretaria da FAV, pessoas maravilhosas que Deus colocou no meu caminho, me ajudando sempre que eu precisava.

À minha amiga Manu, que estava comigo sempre, me dando caronas incansáveis, com muitas risadas e conselhos que quase nunca eram colocados em prática, juntamente com o chocolate quente de todas as semanas com a Karla.

Ao pessoal do laboratório de Micro Med Vet Marcela Lobo, Luciana Lobo (Lã), Diego, Portugal, Dalila, Bárbara, Marcos, Bruno, Ju Pigossi, Kelma (emprestada da parasito) e como deixar de mencionar Roberto Cândido que nos rendeu muitas risadas e virou uma verdadeira “lenda viva”;

À professora Christine Martins que permitiu as coletas nas dependências do Hospital veterinário;

A todos os colegas veterinários que permitiram que eu coletasse material de seus pacientes em suas consultas, em especial, Samara, Andrea, Liris Rejane, Marlon, Luciana, Camila, o pessoal da fisioterapia;

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular, principalmente Marcela Scalon, por ter me ajudado a perder o medo de fazer PCR;

A todos os amigos e irmãos das Igrejas Batista Independente do Planalto, Congregação Batista da Asa Norte, Primeira Igreja Batista em Vila da Penha, e Igreja Batista no Bairro de Metropolitano pelas orações apoio espiritual;

E um agradecimento especial a todos aqueles que torceram por mim, mesmo não estando perto fisicamente, mas sempre em pensamento e em orações. Que Deus abençoe a todos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS -----	x
RESUMO-----	xiii
ABSTRACT-----	xiv
CAPÍTULO I -----	1
INTRODUÇÃO-----	1
REFERENCIAL TEÓRICO -----	2
CLASSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GERAL -----	2
CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DE <i>Escherichia coli</i> -----	2
HABITAT E COLONIZAÇÃO -----	3
CULTIVO E IDENTIFICAÇÃO-----	3
CATEGORIA DIARREIOGÊNICA DE <i>Escherichia. coli</i> -----	4
CLASSIFICAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> EM PATOTIPOS -----	4
<i>EPEC- Escherichia coli ENTEROPATOGÊNICA</i> -----	5
<i>STEC - Escherichia coli</i> PRODUTORA DE TOXINA SHIGA-----	7
<i>EHEC- Escherichia coli</i> ENTEROHEMORRÁGICA -----	7
<i>EAEC – Escherichia coli</i> ENTEROAGREGATIVA -----	8
<i>ETEC- Escherichia coli</i> ENTEROTOXIGÊNICA -----	9
<i>EIEC- Escherichia coli</i> ENTEROINVASORA -----	10
<i>DAEC- Escherichia coli</i> DIFUSAMENTE ADERENTE -----	11
GENOTIPIFICAÇÃO DE <i>Escherichia Coli</i> POR PCR-----	11
ENTEROTOXINAS -----	12
TOXINA LT -TOXINAS TERMOLÁBEIS-----	12
ST - TOXINA TERMOESTÁVEL-----	13
STA -----	13
STB -----	13
TOXINA SHIGA (Stx) -----	14
ADESINAS-----	15
K99-----	16
INTIMINA-----	16

CÃES COMO ANIMAIS DE COMPANHIA	16
OBJETIVOS	18
OBJETIVO GERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO II	36
MATERIAL E MÉTODOS	37
OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	37
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA	37
EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO E DETECÇÃO DE GENES DE TOXINAS	38
PCR	38
RESULTADOS:	40
RESULTADOS DA AMPLIFICAÇÃO:	40
DISCUSSÃO	42
CONCLUSÕES	43
APROVAÇÃO DO COMITÊ:	43
AGRADECIMENTO:	43
REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO III	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS	45

LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS

		Página
Figura 1	Diagrama dos patotipos de <i>E.coli</i> diarreio gênica	18
Figura 2	Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados da amplificação dos genes de Intimina	40
Figura 3	Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados da amplificação dos genes de Stx1	41
Quadro 1	Temperaturas e tempos utilizados na PCR	38
Quadro 2	Oligonucleotídeos utilizados no trabalho e o tamanho dos amplicons	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A/E	Lesão de ligação e esfacelamento
AAF	Fímbria de aderência agregativa
aEPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica atípica
AZI	Azitromicina
AMO	Amoxicilina+Clavulanato
AMP	Ampicilina
AMPc	Adenosina-monofosfato cíclico
BFP	Bundle-forming pilus
BHI	Infuso cérebro-coração
pb	Pares de base
CFA	Antígenos de fator de colonização
CFE	Cefalexina
CFT	Ceftiofur
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNF	Fator citotóxico necrosante
DA	Aderência difusa
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DAF	Decay-acceleration factor
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DOX	Doxiciclina
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAF	EPEC adherence factor
EAST-1	Toxina termoestável 1 de <i>E.coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima
EMB	Eosina Azul de Metileno
ENO	Enrofloxacin
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
GMPc	Guanosina-monofosfato cíclico
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
Hly	Alfa-hemolisina
HUS	Síndrome hemolítica urêmica
IF	Imunofluorescência
IMViC	Testes do Indol, VM, VP e Citrato
kDa	Kilodaltons
LA	Aderência localizada
LEE	Locus of enterocyte effacement
LPS	Lipopolissacarídeo

LT	Toxina termolábil
LT-I	Toxina termolábil-I
LT-II	Toxina termolábil-II
O/F	Oxidação e Fermentação
pAA	Plasmídeo de aderência agregativa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pEPEC	EPEC em suínos
Pet	Plasmid encoded toxin
Pic	Proteína envolvida em colonização intestinal
Pmol	picomol
ShET1	Enterotoxina Shigella 1
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SLT	Shiga-like toxin
SMAC	MacConkey Sorbitol
ST	Toxina termoestável
STa	Toxina termoestável a
STb	Toxina termoestável b
Stx	Shiga toxina
Stx1	Shiga toxina 1
Stx2	Shiga toxina 2
SUL	Sulfonamidas
SUT	Sulfametoxazol + Trimetoprim
tEPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica típica
TET	Tetraciclina
TSI	Triplo açúcar e Ferro
UFC	Unidades formadoras de colônia
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges-Proskauer
VT	Verotoxina

RESUMO

A bactéria *Escherichia coli* é um microorganismo pertencente à microbiota normal de animais e humanos. Os patótipos de *E.coli* podem estar presentes no trato gastrointestinal dos animais carregando genes diarreogênicos (enterotoxinas e adesinas), sem que estes estejam manifestando sinais de diarreia. A proximidade entre humanos e animais pode ser determinante para a transmissão inter-espécie de cepas que contêm genes envolvidos nos mecanismos de patogenicidade do agente. O presente trabalho teve como objetivo detectar os genes STa (toxina termoestável), K99 (F45), Intimina (eae), Stx1 (Toxina Shiga 1), bem como realizar o antibiograma de 48 isolados obtidos de coletas de suabe retal de 50 cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília. Nas amostras testadas nenhum isolado foi positivo para STa e K99. Foram encontrados 21 isolados positivos para Stx1 (43,75%) e 14 isolados positivos (29,2%) para gene de Intimina. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos também foi analisado para os seguintes fármacos: Sulfazotrim, Azitromicina, Enrofloxacina, Ceftiofur, Amoxicilina+Clavulanato, Doxiciclina, Ampicilina, Cefalexina. Os antibióticos que apresentaram maiores percentuais de resistências foram: Ampicilina (25%) Doxiciclina (22,9%) e Cefalexina (20,8%). Já aqueles que demonstraram maiores percentuais de sensibilidade foram Sulfazotrim (87,5%), Azitromicina (85,41%) e Enrofloxacina (77%).

Palavras chave: cães, enterotoxinas, *E.coli*, genes.

ABSTRACT

The bacterium *Escherichia coli* is a microorganism inhabitant of the normal microbiota of animals and humans. Pathotypes of *E.coli* may be present in the gastrointestinal tract of animals harboring genes that cause diarrhea, (enterotoxins and adhesins), they are not manifesting signs of diarrhea. The proximity of humans and animals can be crucial to the inter-species transmission of strains that contain genes involved in the mechanisms of pathogenicity of the agent. The present study aimed to detect the genes STa (heat stable toxin), K99 (F45), Intimin (eae), Stx1 (Shiga toxin 1) and perform susceptibility testing of 48 isolates from rectal swab samples from 50 dogs attended Veterinary Hospital at the University of Brasilia. In any isolated samples tested were positive for STa and K99. 21 positive isolates were found to Stx1 (43.75%) and 14 positive isolates (29.2%) to intimin gene. The antimicrobial susceptibility profile was also analyzed for the following drugs: sulfazotrim, Azithromycin, Enrofloxacin, Ceftiofur, Amoxicilina + Clavulanate, Doxycycline, Ampicillin, Cephalexin. The antibiotics that showed higher percentages of resistance were: ampicillin (25%) Doxycycline (22.9%) and cephalexin (20.8%). Those who have already demonstrated higher sensitivity were sulfazotrim percentage (87.5%), Azithromycin (85.41%) and Enrofloxacin (77%).

Key words: Dogs. Enterotoxins. *E.coli*. Gene.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

As bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae têm distribuição mundial e habitam o trato intestinal de animais e humanos, além de contaminar a vegetação, o solo e a água. Podem ser agrupadas em três categorias: patógenos principais, patógenos oportunistas e não patógenos (QUINN et al., 2005).

Dentre as enterobactérias, a espécie *Escherichia coli* (*E.coli*) apresenta-se como o exemplo mais significativo de bactéria relacionada a diversas doenças, seja pela grande versatilidade de suas cepas na expressão de diferentes mecanismos e fatores de virulência (NAKAZATO, 2001) ou por possuir muitos sorotipos diferentes, que podem ser isolados de fezes tanto de animais hígidos quanto de doentes (DEBROY e MADDOX, 2001).

Podemos ainda observar que muitas linhagens de *E.coli* são de baixa virulência, mas podem causar infecções oportunistas como, por exemplo, em localização extra-intestinal como na glândula mamária, (QUINN et al., 2005). Por este motivo o isolamento de *E.coli* a partir de amostras de fezes e conteúdo intestinal não é suficiente para o diagnóstico da enfermidade, sendo então utilizadas técnicas de soroaglutinação, ELISA, imunofluorescência e PCR (genotipificação) para a biotipificação de adesinas e enterotoxinas (COSTA et al., 2006) que levam à hipersecreção de água e eletrólitos, resultando em diarreia e desidratação (DEBROY e MADDOX, 2001).

Neste contexto, o trabalho aqui relatado teve como objetivo a pesquisa da presença dos genes codificadores de enterotoxinas Sta, Stx1, e as adesinas K99 e intimina, bem como a realização do antibiograma em *E. coli* isolados de cães hígidos ou não, atendidos pelo Hospital Veterinário da Universidade de Brasília.

REFERENCIAL TEÓRICO

Classificação e caracterização geral

Enterobacteriaceae é uma das mais importantes famílias bacterianas, e pode albergar desde o ser vivo mais conhecido, a *E.coli* K12, até muitos dos patógenos mais isolados em humanos e animais (TRABULSI e ALTERNUM, 2008). Caracteriza-se por ser composta por microorganismos gram-negativos anaeróbios facultativos, em formas de bastonetes pleomórficos. Todas as espécies são catalase positivas e negativas à oxidase, fermentam glicose, frequentemente com a produção de gás e crescem bem em meio MacConkey. São móveis por flagelos peritríquios, alguns são imóveis, podem apresentar cápsula ou não e utilizam açúcares por fermentação (OLIVEIRA, 2000).

E.coli sendo um importante patógeno e um componente comensal comum da microbiota intestinal é classificada taxonomicamente segundo Cavalier-Smith (2004) como:

- Domínio Prokaryota
- Reino Bactéria
- Sub reino Negibacteria
- Filo Proteobacteria
- Classe Gammaproteobacteria
- Ordem Enterobacteriales
- Família Enterobacteriaceae
- Gênero *Escherichia*
- Espécie *Escherichia coli*

Caracterização antigênica de *Escherichia coli*

Essa classificação baseia-se na presença dos antígenos O (somático), H (flagelares) e K (capsulares), sendo que os antígenos K não são mais rotineiramente determinados, baseando-se a sorotipagem apenas nos antígenos O e H (GYLES e

FAIRBROTHER, 2010). Nem todas as cepas de *E.coli* apresentam os três tipos de antígenos ao mesmo tempo (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Habitat e Colonização

A colonização do trato intestinal de mamíferos por *E.coli* oriunda de fontes ambientais ocorre logo após o nascimento. Como já mencionado anteriormente, esses microrganismos persistem como membros da microbiota normal do intestino por toda a vida (QUINN, et al, 2005).

Os efeitos patogênicos do microrganismo no intestino ocorrem devidos a dois fatores: a aderência de *E.coli* na parede intestinal, que é mediada por fímbrias e o efeito de enterotoxinas. Estes fatores provocam o aumento na transferência de bicarbonatos de sódio e água, das células ao lúmen intestinal, o que leva a um quadro de diarreia (OLIVEIRA, 2000).

Cultivo e identificação

Escherichia coli é um bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo, capaz de reduzir nitrato a nitrito, de fermentar a glicose (produzindo colônias cor de rosa em ágar MacConkey), é oxidase negativo e catalase positivo. O microrganismo é geralmente móvel com flagelos peritríquios, frequentemente fimbriado, e apresenta reações características típicas nos teste de IMViC (Testes do Indol, VM, VP e Citrato). Quando cresce em meio de cultivo TSI (Triple Sugar Iron Agar), a cor do meio torna-se amarelada devido à fermentação de glicose, sacarose e lactose, que produz ácidos e diminui o pH do meio. É capaz de metabolizar uma ampla variedade de substâncias como carboidratos, proteínas e aminoácidos, lipídeos e ácidos orgânicos. Algumas linhagens produzem colônias com brilho metálico quando crescem em ágar eosina-azul de metileno (EMB -Eosin Methylene Blue). Também crescem bem nos meios de cultivo comuns, formam colônias de tamanho médio (diâmetro de 2 a 3 mm), lisas, brilhantes em ágar sangue a 37°C em 24 horas. Alguns dos sorotipos são hemolíticos formando halo de beta hemólise (TRABULSI E ALTERNUM, 2008; QUINN et al 2005; OLIVEIRA, 2000).

Categorização baseada em critérios patogênicos e clínicos de *Escherichia coli*

A espécie *Escherichia coli* compreende categorias que causam infecção intestinal por diferentes mecanismos e que são denominadas *E.coli* diarreio gênicas, e várias outras especificamente associadas a infecções urinárias, meningites entre outras infecções extra-intestinais, denominadas de *E.coli* patogênica extra intestinal ou EXPEC (Extra Intestinal Patogenic *E.coli*).

CATEGORIA DIARREIOGÊNICA DE *Escherichia coli*

Classificação de *Escherichia coli* em Patotipos

As cepas de *E.coli* que produzem doenças entéricas em pessoas e animais são divididas em 6 patotipos: *E.coli* enteropatogênica (EPEC), *E.coli* enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* enterohemorrágica (EHEC), *E.coli* difusamente aderente (DAEC), *E.coli* enteroinvasora (EIEC) e *E.coli* enteroagregativa (EAEC) (TRABULSI, 2005).

O diagrama com os patotipos resumidos pode ser visto na figura 1.

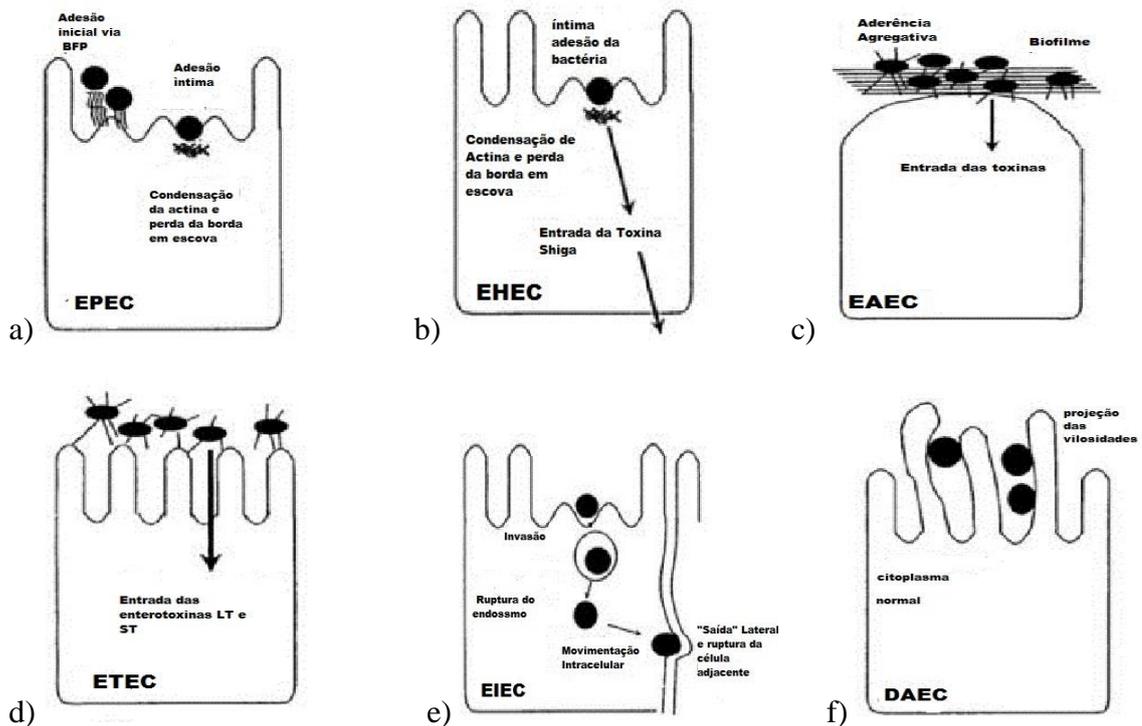


Figura 1: Diagrama dos patotipos de *E.coli* diarreio gênicas.

Fonte: Adaptado de Nataro e Kaper, 1998:

a) *Escherichia coli* Enteropatogênica, que aderem aos enterócitos e entre si por meio da fímbria BFP (Bundle-forming pilus). Após esta etapa, se ligam intimamente à membrana do enterócito

através da adesina intimina promovendo condensação dos filamentos de actina, formação de pedestal e perda da borda em escova resultando em lesões do tipo A/E (adesão e esfacelamento).

b) *Escherichia coli* Enterohemorrágica, que também promove lesões do tipo A/E, além da produção de enterotoxinas do tipo Shiga-Símile (Stx), que é absorvida pelo sistema causando lesões em órgãos alvo; c) *Escherichia coli* Enteroagregativa, caracterizada pela formação de biofilme na superfície do enterócito, pelo padrão AA (aderência agregativa) e produção de citotoxinas; d) *Escherichia coli* Enterotoxigênica, induz diarreia aquosa pela produção das enterotoxinas STa e STb (termoestáveis) e toxinas LT-I e LT-II (termolábeis); e) *Escherichia coli* Enteroinvasora que tem o seu mecanismo de ação semelhante ao da *Shigella* spp., onde invade a célula, e se replica rompendo as vesículas formadas e infectam as células adjacentes promovendo morte celular; f) *Escherichia coli* Difusamente Aderente que se ligam as células através de receptores e induzem a projeção das vilosidades do enterócito.

EPEC- *Escherichia coli* Enteropatogênica

Os primeiros estudos epidemiológicos relacionados com *E.coli* enteropatogênica (EPEC) e diarreia humana foram publicados na Alemanha na década de 1920. Este patotipo está associado com uma vasta variedade de doenças intestinais em humanos e animais. As categorias EPEC são subdivididas em EPEC típica e EPEC atípica. Ambas são desprovidas dos genes que codificam a toxina Shiga (STx) e têm em comum a capacidade de produzir a lesão A/E (Attaching and effacing). As principais diferenças entre os dois grupos referem-se aos sorotipos (combinação de antígenos O e H) e à presença do plasmídeo EAF (EPEC adherence factor) que ocorre nas EPEC típicas. *E.coli* enteropatogênica (EPEC) pode causar diarreia severa em humanos e os sorogrupos mais associados com a doença incluem O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128 e O142 (TRABULSI e ALTERNUM, 2008; STELLA, 2008).

Considera-se que a distribuição entre as cepas EPEC típica e EPEC atípica deve ser baseada na expressão ou não da fímbria bundle forming plus (BFP) codificada pelo Operon bfp, localizado pelo plasmídeo Peaf e na ausência da produção de toxina STx (MOURA, 2009).

Algumas cepas de *E.coli* patogênicas produzem lesões discretas do tipo (AE), caracterizadas por aderência bacteriana íntima em enterócitos e rompimento de citoesqueleto subjacente. Estes isolados foram denominados A/E de *E.coli* (AEEC). As Lesões A/E (Attaching and effacing) foram associadas com *E.coli* enteropatogênica (EPEC) e *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) isolados de seres humanos e também

isolados de cães, porcos, coelhos, bezerros, cavalos, ovelhas e gatos (TRABULSI e ALTHERNUM, 2008; BEAUDRY M. 1996).

Os genes que codificam a lesão A/E estão localizados em uma ilha de patogenicidade denominada região LEE (Locus of enterocyte effacement), que se insere em diferentes sítios cromossômicos, sendo o mais comum o gene que codifica o RNA Transportador da seleno-cisteína (SelC) (TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).

A virulência das EPEC típica e atípica está relacionada principalmente a sua capacidade de aderir à superfície de enterócitos e induzir vias de sinalização que resultam no surgimento de lesões intestinais. Estas lesões reduzem a capacidade de absorção dos intestinos resultando em um quadro de diarreia (MOURA, 2009).

Os principais fatores de virulência das EPEC típicas incluem uma fímbria do tipo IV, BFP, a proteína adesiva Intimina, um sistema de secreção do tipo III (SSTT) e várias proteínas secretadas (TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).

A proteína BFP é encontrada em todas as amostras de EPEC típica e está definitivamente envolvida na adesão *bacteria to bacteria*, no padrão de aderência localizada, mas não há prova definitiva de que a mediação do BFP na adesão real das células epiteliais. Estudos genéticos subsequentes revelaram que um conjunto de 13 genes do plasmídeo EAF é necessário para a expressão e montagem do BFP (NATARO e KAPER, 1998; TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).

Existem três grupos independentes de proteínas que as estirpes de EPEC que podem ser secretar para o sobrenadante da cultura, quando cultivadas em meio de cultura de células. Essas proteínas chamadas de ESPs (proteínas secretadas por EPEC), também são produzidas no curso da doença: EspA, EspB, EspD e participam da estrutura SSTT (sistema de secreção), enquanto as demais proteínas Esp (F,G,H e Z), bem como a proteína MAP (*mitochondrial-associated protein*) são injetadas juntamente com a TIR (*Translocated Intimin Receptor*) no citoplasma do enterócito (NATARO E KAPER, 1998; TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).

Depois de ingeridas as EPEC atravessam a barreira gástrica e aderem à mucosa dos intestinos delgado e grosso, promovendo as alterações que levam à diarreia. Este processo de adesão ocorre em três fases. Na primeira fase ela é superficial, na segunda ocorre transmissão de sinais e na terceira uma aderência mais íntima é estabelecida. Após a aderência inicial, ocorre a montagem o SSTT e também a injeção de algumas proteínas efetoras. Logo após, há a fosforilação das moléculas de Tir e a sua inserção na membrana do enterócito. Por último, ocorre a adesão íntima

que é mediada pela Intimina, que para isso interage com o seu receptor (Tir) promovendo alterações no citoesqueleto que culminam com a lesão A/E. No caso de infecções graves ocorre a completa destruição do epitélio absorptivo intestinal, e acentuada atrofia de vilosidades (TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).

STEC - *Escherichia coli* produtora de Toxina Shiga

O patotipo STEC, diferentemente de outras categorias diarreio gênicas de *E.coli*, é encontrado em uma grande variedade de espécies de animais domésticos e selvagens. Alguns sorotipos de STEC podem causar doenças em animais, tais como a diarreia em bezerros e a doença do edema em suíno (TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).

Esta categoria de *E.coli* diarreio gênica foi caracterizada pela produção de potentes citotoxinas que apresentam a capacidade de inibir síntese proteica de células eucarióticas. O grau de lesão induzida é relativamente grande em certos tecidos e pode relacionar-se a diferenças nos receptores para tais toxinas. A lesão vascular pode levar a edema, hemorragias e trombose. Estas toxinas foram denominadas de verotoxinas (VT), por sua atividade em células Vero, como também de toxinas Shiga (Stx) devido a semelhanças com a toxina produzida por *Shigella dysenteriae* 1. Assim, essas amostras podem ser tanto nomeadas de *E.coli* produtora de Stx (STEC), como *E.coli* produtora de VT (VTEC). As *E.coli* verotoxigênicas que colonizam o intestino podem lesar enterócitos. Quando a verotoxina é absorvida à corrente sanguínea, exerce um efeito deletério nas células endoteliais em localizações anatômicas relativamente definidas, como no SNC de suínos (QUINN et al, 2005; TRABULSI e ALTHERNUM, 2008; NATARO e KAPER, 1998).

EHEC- *Escherichia coli* Enterohemorrágica

No ano de 1983, uma estirpe de *E.coli* sorotipo O157: H7 foi identificado em associação com a ocorrência de diarreia sanguinolenta em humanos, denominada de colite hemorrágica (HC), que conduziu ao reconhecimento de EHEC como uma nova e cada vez mais importante classe de agentes patogênicos entéricos que causam doença intestinal e renal. É o sorotipo de STEC mais comum associado à doença humana, embora existam mais de 100 sorotipos não-O157 que também podem

ocasionar doença humana. Além de SHU, outras complicações como a púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), apendicite, cistite hemorrágica e até mesmo anormalidades neurológicas podem ser observadas (COOMBES, 2011; TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).

O termo *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) foi definido como um subgrupo das STEC e surgiu, inicialmente, para nomear as amostras O157:H7, e é aplicado a esses sorotipos STEC que têm as mesmas características clínicas, epidemiológicas e patogênicas associadas com este protótipo. Muitas estirpes de EHEC produzem lesões A/E. Nem todas as cepas STEC são patogênicas, mas todas as EHEC são consideradas patogênicas (JAFARI et al., 2012, NATARO e KAPER 1998).

Cepas de EHEC são comensais em muitos ruminantes, especialmente bovinos e, portanto, a entrada na cadeia alimentar humana através da contaminação fecal de água, alguns tipos alimentos e carne mal cozida é um fator de risco para a infecção. O reto é o principal local de colonização por EHEC - O157: H7 e atua como uma fonte contínua de contaminação nas fezes (HARTLAND, et al 2013).

A Infecção por STEC/EHEC tem início após a ingestão de alimentos ou água contaminados, algumas vezes com doses infectantes muito baixas, especialmente causadas pelo sorotipo O157:H7. Estima-se que menos de 100 organismos são capazes de causar a doença. A partir de um ou dois dias a diarreia torna-se sanguinolenta e a dor abdominal mais intensa, caracterizando a CH. Os Sorotipos não-O157:H7 são os mais comuns nas Europa, Austrália e América Latina, incluindo o Brasil. Dentre esses mais frequentes sorotipos associados à doença humana, destacam-se O26, O103, O111, O113, O145 (TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).

EAEC – *Escherichia coli* Enteroagregativa

Este patotipo diarreiogênico é a segunda causa mais comum de diarreia dos viajantes após ETEC em países desenvolvidos e em desenvolvimento. É causador de diarreia endêmica e epidêmica em todo o mundo e foi identificada como causador de diarreia aguda em recém-nascidos e crianças em países industrializados (JAFARI et al., 2012).

A característica principal de EAEC é a capacidade de representar um padrão de adesão exclusivo em determinadas linhagens celulares cultivadas *in vitro* como as células HEp-2 e HeLa. No padrão Aderência Agregativa (AA), as bactérias apresentam-se aderidas umas às outras, à superfície das células, bem como à

superfície da lamínula na ausência de células, numa configuração que lembra tijolos empilhados formando agregados heterogêneos ou distribuindo-se em formas de cordões. A configuração em "pilha de tijolos" é considerada uma condição obrigatória para o padrão típico de AA (ANDRADE et al., 2011).

Os mecanismos de patogenicidade de EAEC ainda estão sendo investigados. Várias toxinas e adesinas têm sido descritas. Entre as toxinas descritas, aquelas que são mais bem caracterizadas compreendem a toxina termoestável de EAEC (EAST-1) e a *plasmid-encoded toxin* (Pet). A EAST-1 está relacionada com a toxina termoestável ST de *E.coli* enterotoxigênica, que provoca aumento dos níveis de GMP cíclico em enterócitos e altera a corrente iônica de células intestinais *in vitro* de coelhos. Estudos realizados em humanos e em animais demonstram interação destes microorganismos com epitélio jejunal, ileal e colônico (TRABULSI e ALTHERNUM, 2008; Andrade 2011).

Adultos e crianças são suscetíveis a infecções intestinais causadas por EAEC com pouco ou nenhum vômito. A apresentação clínica da infecção compreende diarreia aquosa, às vezes com sangue e muco e pouca febre. Marcadores inflamatórios tais como interleucina-8, interleucina-1 β e lactoferrina, têm sido detectados nas fezes de grande parte dos pacientes (HARRINGTON et al., 2005).

A colonização por EAEC é detectada por isolamento de *E.coli* a partir de amostras de fezes e demonstrando o padrão de aderência agregativa no ensaio de HEp-2. A implicação de EAEC como causa da doença do paciente deve ser feita com cautela dado a elevada taxa de colonização assintomática em muitas populações. Se nenhum outro organismo está implicado na doença e EAEC é isolado repetidamente, pode ser considerado como uma causa provável de doença no paciente (NATARO e KAPER, 1998).

ETEC- *Escherichia coli* Enterotoxigênica

O patotipo foi denominado assim por sua capacidade de produzir as enterotoxinas termolábil e termoestável. É a categoria que mais causa diarreia severa em leitões, pela produção de toxina termolábil (LT) e/ou toxina termoestável (ST) (BLANCO et al, 1997; TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).). Em humanos é conhecida por causar a diarreia dos viajantes Estas cepas podem expressar apenas uma LT, apenas uma ST ou ambas uma LT e uma ST (NATARO e KAPER, 1998).

O mecanismo de patogenicidade das ETEC compreende a colonização da mucosa intestinal e produção de enterotoxinas. Estas provocam alteração nos níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos levando à alteração no equilíbrio hidrossalino do lúmen intestinal, resultando na secreção e eletrólitos e, conseqüentemente, na redução de absorção de água. A eliminação de água é decorrente do mecanismo de ação das enterotoxinas (TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).

EIEC- *Escherichia coli* Enteroinvasora

E.coli enteroinvasora é um importante agente causador de diarreia no homem. Este grupo causa ceratoconjuntivite experimental em cobaias (teste de Sereny), e invade células do cólon do homem provocando uma infecção semelhante à provocada pelas espécies de *Shigella*, que é um processo de invasão celular. EIEC apresentam propriedades bioquímicas específicas, não descarboxilam a lisina, são lactose negativa e com exceção do sorotipo O124: H30, são imóveis. O mecanismo exato de patogênica EIEC tem ainda que ser elucidado, pois os estudos sobre a patogênese da EIEC sugerem que as suas características patogênicas são praticamente idênticos aos de *Shigella* spp. Ambos os organismos foram caracterizados por invadir o epitélio do cólon, um fenótipo mediado por ambos os loci de plasmídeo e cromossômico. Tanto EIEC quanto *Shigella* spp. podem elaborar uma ou mais enterotoxinas secretoras que podem ter importantes papéis na patogênese da diarreia (NATARO e KAPER, 1998).

A invasão é o principal mecanismo de virulência da EIEC, e compreende a penetração em células epiteliais, seguida pela lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimento direcional no citoplasma e invasão das células adjacentes. A lesão consiste na inflamação e erosão da mucosa, principalmente no intestino grosso. Há uma íntima penetração bacteriana na mucosa, ao contrário do que acontece nas infecções por ETEC, e a ulceração da mucosa é consequência desta penetração (CALIMAN, 2010; FIALHO, 2008; TRABULSI e ALTHERNUM, 2008; NATARO e KAPER, 1998).

Além do processo de invasão como outro fator de virulência em potencial, foi descrita uma enterotoxina termolábil de 62 kDa, denominada ShET2, que é codificada por genes cromossomais. Os fatores de virulência descritos são as proteínas de invasão Ipa, IcsA e IpgC, contidas no plasmídeo denominado plnv (TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).

DAEC- *Escherichia coli* Difusamente Aderente

O termo “*E.coli* difusamente aderente” foi inicialmente utilizado para se referir a qualquer estirpe *E.coli* HEp-2-aderente que não formava microcolônias de EPEC semelhantes. DAEC é um grupo heterogêneo que gera um padrão de aderência difusa, em células HeLa e células HEp-2 e tem sido associado com a diarreia aquosa, que pode tornar-se persistente em crianças pequenas em países desenvolvidos e em desenvolvimento, e com infecções do trato urinário recorrentes. Com a descoberta do EAEC, a maioria dos autores reconhecem agora DAEC como uma categoria independente de potencialmente *E.coli* diarreiogênica (NATARO e KAPER, 1998).

YAMAMOTO et al., 1994 mostraram que as estirpes DAEC são capazes de induzir as projeções na membrana da célula eucariótica semelhantes a dedos que se estendem a partir da superfície de células Caco-2 infectadas ou células HEp-2. Essas projeções aparentemente "incorporam" as bactérias, fornecendo proteção contra a gentamicina, mas sem a internalização completa da bactéria.

Este patotipo ainda é capaz de provocar reação inflamatória nas células intestinais através da indução de secreção de IL-8, citocina capaz de estimular a migração de leucócitos polimorfonucleares. No entanto, algumas estirpes de DAEC não induzem esta secreção em culturas de células de epitélio humano. Isto deve-se ao fato de que o grupo de DAEC é composto por organismos heterogêneos que são diferentes entre si quanto a sua patogenicidade. Assim, se presume que somente a adesão difusa não é suficiente para causar danos no intestino (FIALHO, 2008).

DAEC podem ser identificadas através de ensaios de cultivo celular, onde se observa a presença de um padrão de aderência difusa, e PCR para genes de virulência (FIALHO, 2008; NATARO e KAPER, 1998).

Genotipificação de *Escherichia coli* por PCR

A genotipificação de *E.coli* vem sendo realizada mais comumente com a amplificação de genes codificadores dos seus fatores de patogenicidade, a saber, os genes de enterotoxinas termolábil (LT), termoestável (STa, e STb), as verotoxinas (VT1, VT2) e os genes de fimbrias e de adesinas (BLANCO et al., 1997; VIDAL et al., 2005; SALVADORI et al., 2004; MOREDO et al., 2012).

Enterotoxinas

As enterotoxinas são proteínas ou peptídeos extracelulares, já tendo sido identificadas as toxinas termoestáveis (Sta e STb), termolábeis (LT-I e LT-II) e a Shiga-símile(Stx) (COSTA et al., 2006). Essas toxinas levam à uma hipersecreção de água e eletrólitos, produzindo diarreia e desidratação (DEBROY & MADDOX, 2001). São toxinas que apresentam semelhanças estruturais, antigênicas e funcionais com a toxina colérica (CT) e constituem os determinantes de virulência mais bem caracterizados em ETEC (NATARO e KAPER, 1998; TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).

Toxina LT -Toxinas Termolábeis

Existem duas categorias de LT, LT-I e LT-II, que não reagem de forma cruzada em testes imunológicos. LT-I é encontrada predominantemente em estirpes isoladas de humanos e apresenta maior similaridade com a toxina da cólera, com aproximadamente 80% de identidade na sequência de aminoácidos da CT (Toxina Colérica). LT-II é encontrada principalmente em *E.coli* isoladas de animais e raramente em isolados de humanos (NATARO e KAPER, 1998).

Como membros da família de enterotoxinas do tipo AB₅, as toxinas LT são proteínas oligoméricas de aproximadamente 86 kDa compostas de cinco subunidades B idênticas de 11,5kDa, arranjadas em uma estrutura em anel, em associação a uma subunidade A central de 28 kDa. As subunidades B são responsáveis pelo reconhecimento e a ligação da toxina ao receptor gangliosídico presente na mucosa intestinal (TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).

Após a colonização do intestino delgado pela ETEC e a liberação da LT, a toxina se liga irreversivelmente aos receptores na superfície dos enterócitos e a subunidade A, que tem atividade de ADP-ribosil-transferase, é internalizada e transfere o ADP-ribosil do NAD para a proteína G, que regula a adenilciclase. Este processo resulta na ativação permanente da adenilciclase e no aumento dos níveis de AMPc intracelular, o que estimula a secreção de cloreto e inibe a captação de NaCl. O desequilíbrio de íons resulta na perda de água e diarreia. LT também afeta a síntese de prostaglandinas e leucotrienos que estimulam o transporte de eletrólitos e podem contribuir para o desequilíbrio de íons. Além disso, LT também tem efeitos sobre o sistema nervoso entérico, que controla a motilidade intestinal e

a secreção de íons, e estimula a produção de citocinas pelas células intestinais (FIALHO, 2008; NATARO e KAPER, 1998).

ST - Toxina Termoestável

As enterotoxinas ST são proteínas monoméricas, de baixo peso molecular (5kDa), e que contém múltiplos resíduos de cisteína, formando pontes de dissulfeto, o que lhes confere termoestabilidade. São classificadas em dois subgrupos STa ou (ST-I) e STb ou (ST-II) de acordo com suas propriedades químicas e biológicas (TRABULSI e ALTHERUM, 2008).

STa

As toxinas STa são solúveis em metanol, resistentes a ácido, detergentes e a diversas proteases. Praticamente só as toxinas da classe STa estão associadas com doença em humanos. Essa toxina contém 19 aminoácidos, seis dos quais são cisteínas que formam três pontes dissulfeto intramoleculares. Os genes responsáveis pela produção de STa estão localizados em plasmídeos que são ladeados por sequências de inserção. O receptor-alvo da enterotoxina STa pertence à família de receptores ciclase, guanina ciclase tipo C, localizado na membrana apical dos enterócitos. A ligação de STa no domínio extracelular da guanina ciclase induz sua atividade enzimática, o que provoca aumento de níveis de guanosinamono-fosfato cíclico (GMPc), que é uma molécula sinalizadora de eventos intracelulares de células eucarióticas. Nos enterócitos, ocorre alteração na absorção e secreção de eletrólitos, ou seja, a estimulação de secreção de cloreto e bloqueio da absorção de sódio, resultando no acúmulo de água e eletrólitos no lúmen intestinal (FIALHO, 2008; TRABULSI e ALTHERNUM, 2008; NATARO e KAPER, 1998).

STb

A Toxina Stb é insolúvel em metanol e sua produção é codificada por genes plasmideais. Embora STb tenha sido relacionada com diarreia em suínos, sua ocorrência tem sido também relatada em amostras de ETEC de origem humana. O mecanismo de ação de STb não envolve a ativação de nucleotídeos cíclicos. STb se liga a sulfatídeos, glicoesfingolipídeosacídicos largamente distribuídos na membrana

celular e após ser internalizada, interfere com os níveis intracelulares de cálcio, promovendo a secreção de fluidos. O aumento de cálcio também regula atividade das fosfolipases (A2 e C) que liberam ácido aracdônico, levando à formação de prostaglandinas e leucotrienos, os quais medeiam o transporte de água e eletrólitos através das células intestinais. Ao contrário de STa, STb induz danos histológicos no epitélio intestinal, que consiste em perda de células epiteliais das vilosidades e atrofia parcial das vilosidades. O receptor específico para STb ainda é desconhecido, embora tenha sido sugerido que a toxinas pode ligar-se inespecificamente à membrana plasmática antes da endocitose (NATARO e KAPER, 1998; TRABULSI e ALTHENUM, 2008).

Toxina Shiga (Stx)

A toxina Shiga (Stx) é o principal fator de virulência das STEC (*Escherichia coli* produtora de Toxina Shiga) e constitui uma família de citotoxinas estruturalmente relacionadas e com atividades biológicas semelhantes. Dois grupos distintos são descritos, Stx1 é praticamente idêntica à toxina Stx produzida por *S.dysenteriae*1, e Stx2 apresenta menos de 60% de homologia com a sequência de aminoácidos de Stx1. Essas toxinas apresentam uma estrutura básica comum a várias outras toxinas bacterianas de natureza proteica, representada pelo modelo 1A: 5B. A subunidade A com aproximadamente 32 KDa é composta de duas subunidades: A1 (25KDa) que representa a fração ativa da toxina, e A2 (4KDa) que liga a subunidade A as subunidades B, formada por um conjunto de frações idênticas de 7,7 KDa, responsáveis pela ligação da toxina a um receptor glicolipídico da célula eucariótica. Enquanto Stx1 apresenta pequenas variações em sua sequência de aminoácidos, constituindo um grupo mais homogêneo de toxinas, diversas variantes de Stx2 (Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g), com características antigênicas e biológicas alteradas têm sido descritas, e esta variabilidade reflete primariamente uma diversidade na sequência da subunidade B destas toxinas. A informação genética para a produção de Stx1, Stx2 e algumas variantes de Stx2 pode estar localizada no genoma de Fagos temperados do tipo Lambda, estando integrados ao cromossomo bacteriano, enquanto a produção de Stx de *S. dysenteriae* 1 e da variante Stx2 é codificada por genes cromossômicos (TRABULSI e ALTERNUM, 2008).

O mecanismo de ação das toxinas da família Stx envolve a inibição da síntese proteica na célula alvo, função mediada pela subunidade A1 que apresenta uma

atividade N-glicosidase, o que causa a remoção de um resíduo de adenina na fração 28S da subunidade 60S do ribossomo da célula eucariótica, levando à alteração no sítio aminoacil ribossomal e consequente inibição do processo de tradução e à morte celular (TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).

O envolvimento de Stx na diarreia e enterocolite é demonstrado com as primeiras manifestações, onde o purificado de Stx pode causar o acúmulo de fluidos e lesões histológicas na alças intestinais. Um mecanismo possível para a secreção de fluidos em resposta a Stx envolve a morte seletiva de células epiteliais das vilosidades intestinais. A administração intravenosa em coelhos de Stx1 ou Stx2 purificada pode produzir diarreia sem sangue, sugerindo outros mecanismos potenciais de diarreia, além da ligação da toxina no “topo” das vilosidades (NATARO e KAPER, 1998).

Adesinas

As adesinas, também conhecidas como fímbrias, são grandes agregados de subunidades protéicas arranjadas em filamentos que medeiam a aderência à células alvo no trato gastrintestinal e são altamente imunogênicas. Devido à sua relativa hidrofobicidade, as adesinas podem também promover associação com a membrana dos macrófagos (DEBROY e MADDOX, 2001; QUINN et al, 2005). A microscopia eletrônica de transmissão normalmente revela cepas de ETEC com muitas fímbrias peritríquias, dispostas ao redor da bactéria. Muitas vezes, essas diferentes morfologias de fímbrias podem ser visualizadas na mesma bactéria (NATARO E KAPER, 1998).

As cepas de *E.coli* produzem diferentes tipos de adesinas, e que são associadas com doenças específicas. A maioria das ETEC possui adesinas, que incluem a K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F41, F17, F18, F42 e F165, sendo que as quatro primeiras são as de maior significado nas doenças animais, segundo Quinn et al. (2005). O gene codificante da adesina K88 é geralmente localizado no mesmo plasmídeo que alberga o gene determinante da hemólise, por isso grande parte das cepas que possuem essa fímbria apresenta-se hemolítica em placas de ágar sangue (SOBESTIANSKY et al., 1999). As fímbrias, assim como as enterotoxinas de amostras animais de ETEC geralmente são codificadas por plasmídios, entretanto, a F41 é cromossomal (DEBROY e MADDOX, 2001; QUINN et al., 2005).

K99

A adesina K99, de *E.coli* (ETEC) é um importante fator de virulência produzido por muitos ETEC, que causa a diarreia neonatal em suínos, cordeiros e bezerras. Esta adesina facilita a colonização do intestino delgado pela ETEC, ligando-se a receptores originais em células epiteliais superficiais. É transmissível, sendo geneticamente codificado em um plasmídeo de 87,8 kb (ISAACSON E PATTERSON, 1994, SEIGNOLEM, D.1991).

Intimina

A Intimina é uma proteína de membrana externa de 94 KDa, que apresenta uma alta variabilidade na composição de aminoácidos da sua porção C-terminal. Com base nessa variabilidade, mais de 25 subtipos (tipos imunológicos) já foram descritos, os quais foram denominados com letras do alfabeto grego (α , β , γ , etc.). Os tipos alfa e beta são os mais frequentes entre as EPEC típicas. A porção C-terminal da intimina liga-se a seu receptor, a proteína Tir (*Translocated intimin receptor*), que é translocado e inserido na superfície do enterócito, produzindo uma adesão íntima e irreversível à célula epitelial (TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).

A essência da infecção por EPEC deve-se à interação entre a região C-terminal da intimina e Tir-M, na superfície da célula eucariótica, que gera uma intensa resposta celular. Esta resposta se traduz em alterações estruturais, com rompimento do citoesqueleto da borda em escova, resultantes da mobilização de diferentes proteínas do citoesqueleto e dos microfilamentos de actina que se condensam logo abaixo do local de adesão de EPEC. O resultado dessas alterações é a formação de estruturas elevadas, na superfície celular apical, que se assemelham a pedestais sobre os quais a EPEC adere intimamente. Este conjunto de modificações representa a base da lesão A/E (TRABULSI e ALTHERNUM, 2008).

Cães Como Animais de Companhia

O cão, em particular, é um dos animais domésticos de convivência mais antiga com a espécie humana, datada há mais de dez mil anos. Evidências arqueológicas de tempos remotos revelam que várias sociedades o veneravam como membro familiar (LAGES, 2008).

O número de animais de estimação aumentou substancialmente na sociedade moderna e cada vez mais a atenção é dedicada ao bem-estar animal. Estudos

longitudinais conduzidos em hospitais veterinários indicaram que a resistência a vários antimicrobianos surgiu dentre isolados de animais de estimação como *Staphylococcus intermedius*, *Escherichia coli*, e outras bactérias, incluindo espécies com potencial zoonótico e fenótipos de resistência de interesse clínico (GUARDABASSI, 2004).

Cães e gatos representam fontes potenciais de propagação da resistência antimicrobiana, devido ao uso extensivo de agentes antimicrobianos nestes animais e seu contato próximo com os seres humanos. A relação entre animais de companhia e humanos mudou radicalmente ao longo dos anos, com gatos e cães que estão cada vez mais em contato próximo com os seres humanos, seja tocando, acariciando e por lambedura, o que ocorre com alta frequência (GUARDABASSI, 2004).

Enquanto no passado os cães geralmente eram mantidos fora da habitação familiar, hoje eles são frequentemente mantidos no interior das casas. Os animais de estimação assumiram um papel diferenciado nas relações intrafamiliares, nas residências, nas quais o proprietário identifica o seu animal como um membro da família, participando das atividades diárias, ou visualizando o seu animal como um fator de segurança. Essas relações representam dois lados da interação homem e animal: o antropomorfismo dos animais de estimação versus o animal como recurso de utilidade prática ou econômica (CARVALHO, 2011).

Somada a esta situação, a presença de fatores de virulência em *E.coli* diarreiogênica isoladas de cães podem representar um potencial zoonótico para humanos. A presença destes fatores em cães sem diarreia sugere que estes animais de companhia podem atuar como portadores assintomáticos, evidenciando a importância de estudar a relação existente entre animais de companhia e infecções causadas pela *E.coli* diarreiogênica nesses animais (SARMIENTO et al, 2012).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O Objetivo do presente trabalho foi isolar *E.coli*, com perfis genéticos diarreiogênicos, de cães atendidos no hospital veterinário da Universidade de Brasília.

Objetivos Específicos

- Detectar a presença dos Genes de enterotoxinas (STa, Stx1);
- Detectar a presença dos Genes das adesinas (K99 e Intimina) por meio da utilização da técnica de Reação de Polimerização em Cadeia do DNA (PCR);
- Definir um perfil de sensibilidade, testando as amostras para os seguintes antibióticos: Sufazotrim, Azitromicina, Enrofloxacina, Ceftiofur, Amoxicilina + Clavulanato, Doxiciclina, Ampicilina, Cefalexina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, JACY ALVES DE B.; HAAPALAINEN, EDNA FREYMÜLLER e FAGUNDES-NETO, ULYSSES. *Escherichia coli* entero agregativa Como Agente provocador de diarreia persistente: Modelo experimental utilizando microscopia Óptica de luz. **Rev. paul. pediatr.** [online]. , vol.29, 2011.

BEAUDRY M., C. ZHU, J. M. FAIRBROTHER, AND J. HAREL. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Dogs Manifesting Attaching and Effacing Lesions **Journal Of Clinical Microbiology**, p. 144–148 Vol. 34, No. 1 Jan. 1996.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E; BLANCO, J.; MORA, A.; PRADO, C.; ALONSO, M. P.; MOURIÑO, M.; MADRID, C.; BALSALOBRE, C.; JUÁREZ, A. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy cattle. **Veterinary Microbiology**. Vol. 54: 309-319, 1997.

BRIAN K. COOMBES, MATTHEW W. GILMOUR, CHELSEY D. GOODMAN **The Evolution of Virulence in Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Front Microbiol.** 2011.

CALIMAN, M.C.W. **Estudo De Vigilância Bacteriológica: Isolamento, Fatores De Virulência E Resistência Antimicrobiana De Cepas De *Escherichia coli* Isoladas De Gatos Domésticos Na Região De Ribeirão Preto.** JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus II de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre

CARVALHO, R. L. S. **Animais de estimação nas famílias contemporâneas: padrões de comportamento e consumo / Roberto Luís da Silva Carvalho.** – 2011. 156 f. Dissertação de mestrado. (Curso de Mestrado em Estudos Populacionais e Pesquisas Sociais) – Escola Nacional de Ciências Estatísticas, Rio de Janeiro, RJ, 2011.

CAVALIER-Smith, T. Only six kingdoms of life. **Proc. R. Soc. Lond. B** 271: 1251–1262, 2004.

COOKSON S T, NATARO J P. Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia coli*. **Microb Pathog.** 1996:421–434 PubMed .

COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; SPRICIGO, D. A.; WITT, N. M.; MARCHIORO, S. B.; KOLLING, L.; VARGAS, A. P. C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** Vol. 26, No. 1: 5-8, 2006.

COOMBES BK, GILMOUR MW, GOODMAN CD. The evolution of virulence in non-o157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Department of Biochemistry and Biomedical Sciences, The Michael G. DeGroote Institute for Infectious Disease Research, McMaster University Hamilton, ON, Canada. **Front Microbiol.** 2011;2:90. doi: 10.3389/fmicb.2011.00090. Epub 2011 Apr 25.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Disponível em <www.clsi.org>. acesso em 12/04/13

DEBROY, C.; MADDOX, C. W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. **Animal Health Research Review**. Vol. 1, No. 2: 129-140, 2001.

FIALHO, O. B. **Identificação de estirpes de *Escherichia coli* diarreogênicas por PCR-multiplex**. Curitiba: UFPR, Setor de Ciências da Saúde, 2008. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pets animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 54, n. 2, p. 331-332, 2004.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2010. 643 p.

HARRINGTON, S. M., DUDLEY, E. G. AND NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, 254: 12–18. 2006.

HARTLAND, Elizabeth L; LEONG, John M. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E.coli*: ecology, pathogenesis, and evolution *Front Cell Infect Microbiol*. **2013; 3: 15**. Published online April 2013.

ISAACSON R.E and PATTERSON S. **Analysis of a naturally occurring K99+ enterotoxigenic *Escherichia coli* strain that fails to produce K99**. *Infect Immun*. 1994 October; 62(10): 4686–4689.

JAFARI A, ASLANI MM, BOUZARI S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. *Iran J. Microbiol*. 2012 Sep;4 (3): 102-17

LAGES, S.L.S. **Avaliação da população de cães e gatos com proprietário, e do nível desconhecimento sobre a raiva e posse responsável em duas áreas contrastantes da cidade de Jaboticabal, São Paulo**. [Dissertação de Mestrado]. Jaboticabal – Universidade Estadual paulista, 2008.

MOREDO, F. A; CAPPUCCIO, J. A; INSARRALDE, L; PERFUMO, C. J; QUIROGA, M. A; LEOTTA, G. A. Caracterización genotípica de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos con diarrea posdestete y enfermedad de los edemas. **Rev. argent. microbiol**. vol.44 no.2 Ciudad Autónoma de Buenos Aires abr./jun. 2012.

MOURA, R. A; SIRCILLI, M.P; LEOMIL, L; MATTÉ, M. H; TRABULSI, W. P.E; IRINO, K; CASTRO, A. F. P. **Clonal Relationship among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Animal Species and Humans**. *Appl Environ Microbiol*. 2009 December; 75(23): 7399–7408. Published online 2009 October 2. doi: 10.1128/AEM.00636-09 PMID: PMC2786407

NAKAZATO, G.. **Estudo dos Fatores de Virulência em Amostras de *Escherichia coli* Isoladas de cães com diarreia e normais. Características de Intiminas produzidas detectáveis pela Reação de Cadeia de Polimerase**. Campinas SP - Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. 2001.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. Vol. 11, No. 1: 142-201, 1998.

OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia Veterinária: Guia bacteriológico prático**. 2.ed. Canoas: Ulbra, 2000. 237p.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

SARMIENTO, J. J.P; MEDEIROS L. P.; CHICONI C. A.; MARTINS F. H.; ZANUTTO M.S.; PELAYO J, S; KOBAYASHI, R. K. T ; NAKAZATO ,G.; **Pesquisa de *Escherichia coli* diarreiogênica em cães e gatos como possíveis fontes de infecção humana**. XXI Congresso Latino Americano De Microbiologia- Santos, Brasil, 2012. Anais...2012.

SEIGNOLE D, MOURICOUT M, DUVAL-IFLAH Y, QUINTARD B, JULIEN R. Adhesion of K99 fimbriated *Escherichia coli* to pig intestinal epithelium: correlation of adhesive and non-adhesive phenotypes with the sialoglycolipid content. **J Gen Microbiol**. 1991 Jul;137(7):1591-601.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S.; MORES, N.; OLIVEIRA, S. J.; CARVALHO, L. F. O.; MORENO, A. M.; ROEHE, P. M. **Clínica e Patologia Suína**. 2 ed. Goiânia, 1999. 464p.

STELLA, A. E. **Fatores de Virulência em Isolados de *Escherichia coli* Provenientes de Amostras de Água, Leite e Fezes de Bovinos Leiteiros da Região de Ribeirão Preto – SP, Brasil**. Jaboticabal: Unesp, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009. 85 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária)

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008,790p.

VIDAL et al, Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, Oct. 2005, p. 5362–5365 Vol. 43.

YAMAMOTO T, KANEKO M, CHANGCHAWALIT S, SERICHANTALERGS O, IJUIN S, ECHEVERRIA P. Actin accumulation associated with clustered and localized adherence in *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. **Infect Immun**. 1994 Jul;62(7):2917-29 Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo, Japan.

CAPÍTULO II

Deteção de genes de Enterotoxinas e Adesinas de *Escherichia coli* isoladas de fezes de caninos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília.

Detection of genes for enterotoxins and adhesins of *Escherichia coli* isolated from feces of dogs treated at the Veterinary Hospital of the University of Brasilia.

Anne Dianne Sousa da Silva Marques^{1*} Simone Perecmanis²

¹Mestrando em Saúde Animal, Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), Brasília – DF

² Professor adjunto IV da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), Brasília – DF *dianne.maximo@gmail.com

INTRODUÇÃO

As bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae têm distribuição mundial e habitam o trato intestinal de animais e humanos, além de contaminar a vegetação, o solo e a água e podem ser arbitrariamente agrupadas em três categorias: patógenos principais, patógenos oportunistas e não patógenos (QUINN et al., 2005).

Dentre as enterobactérias, a espécie *Escherichia coli* (*E.coli*) apresenta-se como um dos exemplos mais significativos de bactéria relacionada a diversas doenças devido a sua grande versatilidade na expressão de diferentes mecanismos e fatores de virulência (NAKAZATO, 2001), possuindo diferentes sorotipos e podendo ser isoladas de fezes tanto de animais hígidos quanto de doentes

(DEBROY e MADDOXX, 2001). Neste contexto, observa-se que muitas linhagens de *E.coli* são de baixa virulência, mas podem causar infecções oportunistas (QUINN et al., 2005).

Por este motivo o isolamento de *E.coli* a partir de amostras de fezes e conteúdo intestinal não é suficiente para o diagnóstico da enfermidade. Nesse sentido, as técnicas de soroaglutinação, ELISA, imunofluorescência e PCR (genotipificação) podem ser empregadas para a biotipificação de adesinas e toxinas (COSTA et al., 2006).

O trabalho aqui relatado teve como objetivo a pesquisa da presença dos genes codificadores das enterotoxinas Sta, Stx1, e as Adesinas K99 e Intimina com o uso da técnica de reação de polimerização em cadeia de DNA, em cepas de *E.coli* isoladas de cães hígdos ou não, atendidos pelo hospital veterinário da Universidade de Brasília.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das Amostras

Foram obtidas amostras fecais de 50 cães de ambos os sexos, hígdos ou não, atendidos no hospital Veterinário da Universidade de Brasília. As amostras foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais com uso de suabes estéreis e foram acondicionadas em meio de transporte Stuart ® e encaminhadas diretamente ao laboratório de Microbiologia Médica Veterinária para processamento. Das 50 amostras coletadas, foram obtidos 48 isolados.

Isolamento e identificação bioquímica

As amostras foram inoculadas em ágar MacConkey (Merck®), e incubadas por 24 horas a 37 °C. Após este período os meios foram observados para a seleção de colônias que apresentavam coloração rósea avermelhadas, típica de fermentação da lactose no meio. As selecionadas foram repicadas em ágar sangue ovino a 5% para verificação da presença de hemólise e identificação bioquímica. Cada colônia fermentadora recebeu uma numeração sequencial de acordo com o número do animal (01, 02, 03,...) e, caso uma amostra apresentasse mais de uma colônia fermentadora, caracteristicamente distinta na mesma placa de Petri, cada uma das colônias recebia uma letra, além da numeração (A, B, C).

Todas as amostras foram testadas para a presença de Indol, reação ao Vermelho de Metila (VM), Voges-Proskauer (VP), utilização de Citrato, fermentação de açúcares em *Triple Sugar Iron* (TSI), conforme Quinn et al, 1994 e inoculadas também em meio EMB (Eosina Azul de Metileno). Os isolados confirmados como *E.coli*, foram utilizados posteriormente para a realização de antibiograma e para a extração do DNA, para pesquisa de genes de enterotoxinas e adesinas.

Extração de DNA Bacteriano e Detecção de Genes de Toxinas

As bactérias foram cultivadas em agar sangue a 37°C por 24h. Depois desse período, foram retiradas três colônias e colocadas em 300 µl água Milli-Q em tubos Eppendorf® e homogeneizados em vórtex. Os tubos foram levados ao banho-maria, 100°C por 10 minutos, para rompimento das células e liberação do DNA, e depois levados à centrifuga (SIGMA® 2K15) por 15 minutos, 13.000g, 4°C.

PCR

Após este processo o sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta para utilização na PCR, segundo protocolo citado por Blanco et al.,1997. As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 5µl do DNA extraído; 2,5µl de solução tampão (10X, PHT ®); 1,5µl de dNTP (10 mM, Invitrogen®); 0,25µl de Taq DNA polimerase (5U/µl, pht®) e 0,5µl de cada primer (Tabela 1) na diluição de 10 pmol/µl. Para cada reação, eram feitos testes com controles negativos, com água Mili-Q, e controles positivos, utilizando-se amostras sabidamente positivas para as enterotoxinas e adesinas testadas, cedidas pelo professor Marcos Bryan Heinemann da Escola de Veterinária da UFMG.

Quadro 1 - Temperaturas e tempos utilizados na PCR

	Toxina	Etapa	Temperatura	Tempo	N° de ciclos
Comum a todos	Todas*	Desnat. Inicial	94°C	2 minutos	1 ciclo
	Intimina	Desnat. Inicial	94°C	5 minutos	1 ciclo
	Todas	Desnaturação	94°C	1 minuto	30 ciclos
Individual (por toxina)	STa	Anelamento	60°C	2 minutos	30 ciclos
	Intimina	Anelamento	55°C	1 minuto	30 ciclos
	K99	Anelamento	60°C	2 minutos	30 ciclos
	Stx1	Anelamento	57°C	2 minutos	30 ciclos
Comum a todos	Todas	Extensão	72°C	2 minutos	30 ciclos
	Todas	Exten. Final	72°C	2 minutos	1 ciclo

As ampliações foram realizadas segundo SALVADORI et al., 2004 em termociclador da marca Techne®. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, e posteriormente corados com brometo de etídio visualizado em transiluminador de ultravioleta (UVP®).

Quadro 2 – Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho e o tamanho dos amplicons

Toxina / adesina	Sequência de Oligonucleotídeos	Tamanho do Amplicon (pb)
Sta	5- TCCGTGAAACAACATGACGG -3 5- ATAACATCCAGCACAGGCAG -3	244
Stx1	5- AGGTTGCAGCTCTCTTTCAATA -3 5- TGCAAACAAATTATCCCCTGAG -3	364
K99(F5)	5-TGGGACTACCAATGCTTCTG-3 5-TATCCACCATTAGACGGAGC-3	450
Intimina (eae)	5-GACCCGGAACAACAAGCATAAGC-3 5-CCACCTGCAGCAACAAGAGG-3	384

STa = toxina termoestável A; Stx1= toxina de Shiga 1;pb = pares de bases.

Fonte: Salvadori et al., 2004

Perfil Antimicrobiano

As colônias de *E.coli* foram inoculadas em caldo Müeller-Hinton (Himedia®) e incubadas a 37°C até apresentar turbidez de 0,5 na escala de McFarland. Foram então passadas em ágar Müeller-Hinton (Bio-Rad®), segundo o método de Kirby-Bauer modificado, em recomendação do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010). As cepas foram testadas para os seguintes antibióticos: Cefalexina 30µg, Doxiciclina 30µg, Enrofloxacina5µg, Sulfazotrim (Sulfametoxazol + Trimetoprim) 25µg, Ampicilina 10µg, Azitromicina, Amoxicilina+clavulanato, Ceftiofur. As placas foram incubadas a 37°C por 18h, sendo interpretado o halo de inibição após esse tempo, conforme tabela do CLSI (2010).

Resultados:

Resultados da amplificação:

Os resultados obtidos com a realização da técnica de PCR demonstraram que nenhum dos 48 isolados de *E.coli* obtidos neste trabalho foi positivo para a presença dos genes Sta e K99. Porém, 14 isolados (29,2%) foram positivos para o gene de Intimina (*eae*), (figura 2) e 21 isolados (43,7%) foram positivos para a presença do gene Stx1 (figura 3). Doze isolados foram positivos para ambos os genes pesquisados de Stx1 e Intimina. Entre os 48 isolados de *E.coli* apenas 1, em que foi detectado o gene Intimina, amostra 22, se originou de cão com quadro clínico de diarreia.

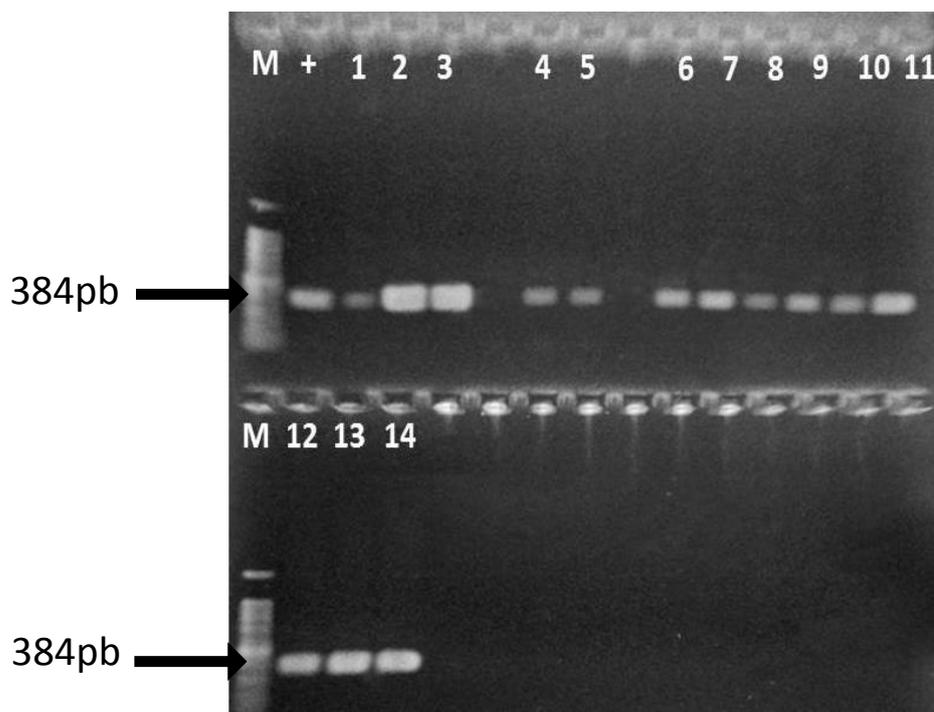


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados da amplificação dos genes de Intimina. M = Marcador de peso Molecular; + (Controle Positivo); 1 (amostra 10); 2 (amostra 22A); 3 (amostra 22B); 4 (amostra 38); 5 (amostra 39); 6 (Amostra 40); 7 (Amostra 41); 8 (Amostra 42); 9 (Amostra 43); 10 (Amostra 44); 11 (Amostra 45); 12 (Amostra 48A); 13 (Amostra 48B); 14 (Amostra 49C).

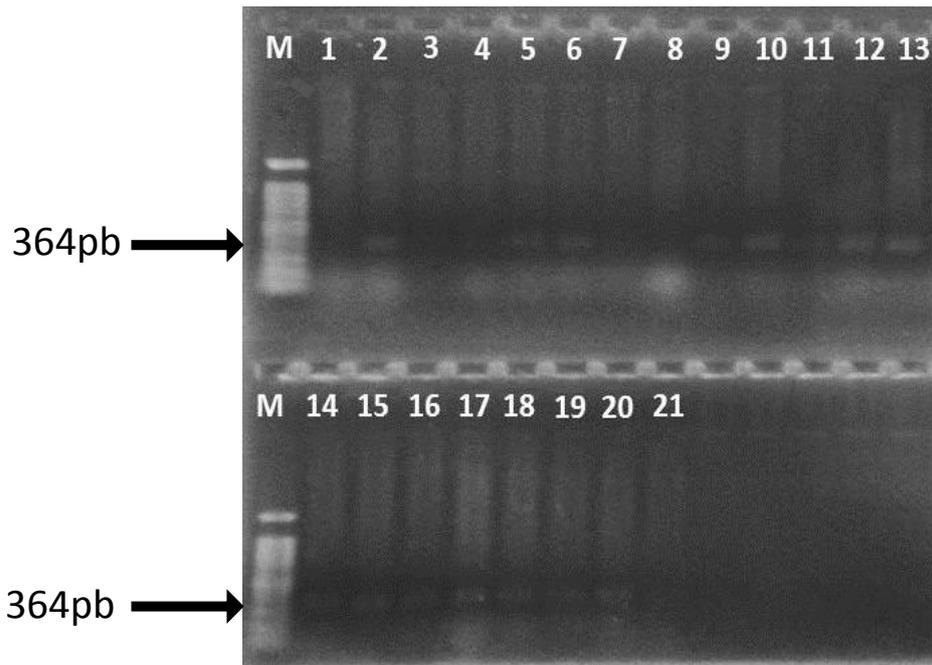


Figura3 : Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados da amplificação dos genes de Stx1. M = Marcador de peso Molecular; 1 (amostra 02); 2 (amostra 04); 3 (amostra 05); 4 (amostra 09); 5 (amostra 10); 6 (amostra 12), 7 (amostra 13A); 8 (amostra 13B); 9 (amostra38); 10 (amostra 39); 11 (amostra 40);12 (amostra 41); 13 (amostra 42); 14 (amostra 43); 15 (amostra 44); 16 (amostra 45); 17 (amostra 48A); 18 (amostra 48B); 19 (amostra 49A); 20 (amostra 49B); 21 (amostra 49C).

Resultados do antibiograma:

Com a realização do antibiograma foi possível traçar um perfil de sensibilidade dos isolados testados. Os isolados de *E.coli* apresentaram maiores percentuais de sensibilidade aos seguintes antibióticos: Sufazotrim (87,5%), Azitromicina (85,4%), Enrofloxacina (77,1%), Ceftiofur (64,6%), Amoxicilina + Clavulanato (62,5%), Doxicilina (50%), Ampicilina (45,83%), Cefalexina (33,3%). Os maiores percentuais de resistências aos antibióticos foram apresentados para Ampicilina (25%), Doxicilina (22,9%), Cefalexina (20,8%), Enrofloxacina (12,5%), Sulfazotrim (12,5%), Amoxicilina + Clavulanato (10,4%), Ceftiofur (8,3%), Azitromicina (2,1%).

Discussão

A bactéria *E.coli* é um dos mais comuns componentes da microbiota normal intestinal. Algumas cepas de *E.coli* têm sido reconhecidas como causas de diarreia em humanos e animais (NAKAZATO, 2001). Levando-se em conta a proximidade existente entre animais de companhia e humanos, e a importância de *E.coli* diarreiogênicas para a saúde pública, estudos envolvendo a detecção de fatores de patogenicidade destes microorganismos são importantes sob o ponto de vista epidemiológico e preventivo.

NAKAZATO em 2001, em um experimento com 137 cães diarreicos e 34 cães normais, relatou que o gene *eae*, que codifica a Intimina, foi encontrado em amostras de *E.coli* de 22 cães, sendo 3 normais e 19 com diarreia. No mesmo trabalho nenhuma amostra dos 22 cães encontrados positivos para intimina apresentou-se positivo para o gene de toxinas Termosotáveis (ST).

SARMIENTO et al., 2012, isolou cepas de *E.coli* de fezes de 25 cães com diarreia e 25 cães sem diarreia. Dos isolados de *E.coli*, 6 cepas foram positivas para o gene *eae* (3 de cães com diarreia); e uma cepa de cão sem diarreia para os genes *eae*.

PAULA, 2008 isolou 92 cepas de *E.coli* de 25 cães diarreicos e entre seus achados se incluem sete amostras (7,6%) positivas para Stx1, cinco positivas para Sxt2 e nove amostras (9,8%) apresentaram o gene *eae* isoladamente. As cepas que apresentaram genes de virulência foram também analisadas quanto à resistência a 12 antimicrobianos, sendo os mais resistentes Cefalotina (87,7%), Estreptomicina (81%), Amoxicilina (71,4%), e Gentamicina (71,4%), que não foram os antimicrobianos de objeto nesse estudo.

A preocupação com a possível transferência de *E.coli* diarreiogênica de animais para humanos deve abranger também a possibilidade de compartilhamento de genes de resistência aos antimicrobianos nestes microrganismos. Proprietários de animais de companhia e suas famílias geralmente tem contato próximo com os animais, o que oferece a oportunidade para compartilhamento de bactérias (HEUER, 2005).

CONCLUSÕES

No presente estudo foram encontrados genes de enterotoxinas e adesinas em cepas de *E.coli* isoladas de cães aparentemente hígidos o que indica a circulação destes genes sem necessariamente a manifestação de sinais clínicos compatíveis com diarreia. A proximidade entre os cães e o homem é um fator determinante para que esses animais sejam parte de uma possível cadeia zoonótica na transmissão dos microorganismos portadores desses genes.

APROVAÇÃO DO COMITÊ:

Este trabalho foi avaliado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, tendo sido aprovado sob número de UnBDOC 134069/2012.

AGRADECIMENTO:

À CAPES pelo apoio financeiro da bolsa proporcionada à estudante.

REFERÊNCIAS

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; BLANCO, J.; MORA, A.; PRADO, C.; ALONSO, M. P.; MOURIÑO, M.; MADRID, C.; BALSALOBRE, C.; JUÁREZ, A. **Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy cattle. *Veterinary Microbiology*. Vol. 54: 309-319, 1997**

COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; SPRICIGO, D. A.; WITT, N. M.; MARCHIORO, S. B.; KOLLING, L.; VARGAS, A. P. C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** Vol. 26, No. 1: 5-8, 2006.

DEBROY, C.; MADDOX, C. W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. **Animal Health Research Review**. Vol. 1, No. 2: 129-140, 2001.

FIALHO, O. B. **Identificação de estirpes de *Escherichia coli* diarreogênicas por PCR-multiplex**. Curitiba: UFPR, Setor de Ciências da Saúde, 2008. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

NAKAZATO, G. **Estudo Dos Fatores De Virulência Em Amostras De *Escherichia coli* Isoladas De Cães Com Diarreia e Normais**. Características De Intiminas Produzidas Detectáveis Pela Reação de Cadeia de Polimerase. Campinas SP - Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. 2001.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. Vol. 11, No. 1: 142-201, 1998.

OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia Veterinária: Guia bacteriológico prático**. 2.ed. Canoas: Ulbra, 2000. 237p.

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

QUINN, P. J.; MARKEY, B.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005 512p

SALVADORI, M. R.; VALADARES, G. F.; LEITE, D. S.; BLANCO, J.; YANO, T. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. Vol. 34: 230-235, 2003

SARMIENTO, J. J.P; MEDEIROS L. P.; CHICONI C. A.; MARTINS F. H.; ZANUTTO M.S.; PELAYO J, S; KOBAYASHI, R. K. T ; NAKAZATO ,G.; **Pesquisa de *Escherichia coli* diarreio gênica em cães e gatos como possíveis fontes de infecção humana**. XXI Congresso Latino Americano De Microbiologia- Santos, Brasil, 2012. Anais...2012.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760p.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Cães hígidos podem carrear genes de adesinas e enterotoxinas, e a falta de manifestação de sintomas diarreicos não podem excluir a presença destes microrganismos patogênicos do diagnóstico. A proximidade de cães e humanos também pode ser um facilitador para que esses genes causadores de diarreia sejam possíveis agentes zoonóticos.