

OCORRÊNCIA DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM ESTIRPES DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE FEZES DE CÃES ERRANTES

A.C.M.D.G. von Sydow, J.A. Coogan, A.M. Moreno, P.A. Melville, N.R. Benites

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: aguercio@usp.br

RESUMO

Escherichia coli pode causar doenças em humanos e animais, tais como infecções do trato urinário, septicemia, meningites e gastroenterites. Cães assintomáticos podem participar da cadeia epidemiológica como reservatório de *E. coli* patogênica ao homem. Este estudo objetivou avaliar a ocorrência de *E. coli* patogênica ao homem em fezes de cães errantes sem sintomas de colibacilose e assim averiguar a participação do cão como fonte de infecção de colibacilose humana. Foram coletadas 220 amostras de fezes de animais capturados por diferentes Centros de Controle de Zoonoses do Estado de São Paulo. As amostras foram submetidas a exames microbiológicos sendo isoladas 196 (89,09%) estirpes de *E. coli*, cujos genes de fatores de virulência foram detectados por PCR. Cento e vinte e três (62,75%) estirpes apresentaram um ou mais dos fatores de virulência estudados. Dezesesseis (8,16%) foram positivas para *afa*, 54 (27,55%) para *sfa*, 38 (19,38%) para *pap*, 66 (33,67%) para *aer*, 31 (15,81%) para *cnf*, 13 (6,63%) para *hly*, 1 (0,51%) para VT2 e nenhuma das linhagens foi positiva para LT, STa e STb. Cães errantes aparentemente saudáveis podem participar da cadeia epidemiológica como reservatórios de *E. coli* uropatogênica ao homem, pois os genes encontrados com maior frequência estão presentes em infecções extraintestinais urinárias.

PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia coli*, fezes, cães, fatores de virulência, PCR.

ABSTRACT

OCCURENCE OF VIRULENCE FACTORS IN LINEAGES OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM FAECES OF STRAY DOGS. *Escherichia coli* may cause diseases in humans and animals, such as urinary infections, septicemia, meningitis and gastroenteritis. Asymptomatic dogs can participate in the epidemiologic chain as a reservoir of human pathogenic *E. coli*. The objective of the present study was to evaluate the occurrence of pathogenic *E. coli* in humans, on faeces of stray dogs without colibacillosis symptoms, and thus verify the participation of dogs as a source of human colibacillosis infection. Two hundred and twenty samples of faeces from animals captured by different Zoonotic Control Centers in São Paulo state, Brazil, were collected. These faeces, when submitted to microbiological exams, resulted in the isolation of 196 (80.09%) strains of *E. coli*, whose virulence genes were detected by PCR. At least one of the virulence factors studied was present in 123 (62.75%) strains. Sixteen (8.16%) were *afa* positive, 54 (27.55%) were positive to *sta*, 38 (19.38%) to *pap*, 66 (33.67%) to *aer*, 31 (15.81%) to *cnf*, 13 (6.63%) to *hly*, 1 (0.51%) to VT2, and none of the strains were positive for LT, STa or STb. Stray dogs which were apparently healthy could be participating in the epidemiologic chain as an *E. coli* reservoir uropathogenic to man, as the genes found in a higher frequency are present in extraintestinal infections, or more specifically, urinary infections.

KEY WORDS: *Escherichia coli*, faeces, dogs, virulence factors, PCR.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é considerada habitante natural do trato intestinal de animais e do homem, mas também aparece como uma importante causa de diarreias, infecções urinárias, mastites, septicemias, meningi-

tes. Tem sido responsável por causar diarreia seguida de morte em crianças de países em desenvolvimento, assim como colite hemorrágica (HC), síndrome urêmica hemolítica (HUS) em crianças e adultos em países desenvolvidos. Veículos de infecção têm sido alimentos de origem animal, água e alimentos mal lavados

como frutas, verduras e raízes. (DROLET *et al.*, 1994; SUSSMAN, 1997; TRABULSI; CAMPOS, 1999; GUTH *et al.*, 2002; YATSUYANAGI *et al.*, 2002).

A habilidade de *E. coli* em causar doença em humanos é devida à presença de vários fatores de virulência localizados em genes plasmidiais e/ou cromossomais (DONNENBERG; WHITTAM, 2001). A patogenicidade do microrganismo está relacionada à forma como a bactéria se liga à célula do hospedeiro, à produção de toxinas e a sua invasão (SEARS; KAPER, 1996; FARMER III, 1999).

Existem relatos da ocorrência de colibacilose em cães e gatos, além de outros animais, tendo sido relatadas infecções urinárias, prostatites, vaginites e piometra, além de septicemias e endotoxemias (BEUTIN 1999).

O grupo das *E. coli* uropatogênicas (UPEC) está associado a doenças no trato urinário tanto em humanos como em animais. As adesinas mais importantes nas infecções urinárias são os *pili*. As fimbrias S (*sfa*) estimulam a produção de Interleucina-6 pelas células do epitélio renal na presença de UTI (infecção do trato urinário) (SAYLERS; WHITT, 1994). As fimbrias tipo 1 participam na colonização da bexiga e trato urinário inferior. A adesina das estirpes que infectam os rins é a fimbria P, que está associada às pielonefrites (CHEN *et al.*, 2003).

Hemolisinas são citotoxinas (HlyA) que conduzem a uma lise osmótica principalmente de eritrócitos (TRABULSI; CAMPOS, 1999; RIBEIRO, 2001). *E. coli* uropatogênicas podem apresentar a habilidade de adquirir ferro, utilizando sideróforos, exoproteínas codificadas pelo gene *aer* plasmidiais (SAYLERS; WHITT, 1994). A aerobactina, sideróforo bacteriano, tem sido associada a estirpes de *E. coli* que causam pielonefrite e cistite em humanos (JOHNSON *et al.*, 1988).

O fator necrotizante citotóxico (NTEC), está associado com infecções extraintestinais (septicemia e infecção do trato urinário) e enterites no homem e animais (SEARS; KAPER, 1996; RIBEIRO, 2001).

Sete fatores de virulência (FVs), incluindo pilus tipo 1 (*pili*), pilus associado com pielonefrite (*pap*), fimbria S (*sfa*), adesina afimbrial I (*afa I*), hemolisina (*hly*), aerobactina (*aer*) e fator citotóxico necrotizante (*cnf*) desempenham um importante papel no desenvolvimento de UTI humanas. Linhagens de *E. coli* isoladas de cães e gatos com UTI são similares às estirpes de *E. coli* isoladas de UTI humana. *Pili* foi o fator de virulência mais comumente encontrado entre as linhagens UPEC isoladas de cães e gatos e de humanos. Além disso, esta fimbria foi frequentemente observada em estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de cães e gatos saudáveis. O gene codificador da fimbria P foi encontrado com maior frequência em fezes de cães saudáveis (YURI *et al.*, 1998; KURAZONO *et al.*, 2003). *Escherichia coli* isolada de fezes de cães, comumente

exibem características típicas de ExPEC humana (*E. coli* extraintestinal), podendo ser relacionados com isolados clínicos de pacientes humanos com cistite, pielonefrite, bacteremia ou meningite (JOHNSON *et al.*, 2001).

Cães têm sido apontados como potenciais reservatórios de linhagens de *E. coli* que causam UTI em humanos, pelo fato destes microrganismos apresentarem proximidade filogenética, de sorogrupos e certos fatores de virulência associados com *E. coli* extraintestinal isolados de fezes e urina caninos, sugerindo a ocorrência de transmissão de *E. coli* patogênica entre cães e humanos (SANNES *et al.*, 2004).

Cães e gatos compõem um grupo de animais de grande proximidade ao homem. Como conseqüência, a possibilidade de transmissão de microrganismos entre estas espécies de hospedeiros é extremamente elevada (BEUTIN, 1999).

O presente estudo teve como objetivo verificar a ocorrência de *E. coli* nas fezes de cães errantes, com ausência de sintomas de colibacilose, avaliando a possível presença de fatores de virulência nessas estirpes que apresentam similares às observadas nas linhagens isoladas de infecções em humanos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das amostras

A coleta do material foi realizada nas dependências dos Centros de Controle de Zoonoses (CCZs) pertencentes aos Municípios de Guarulhos, Cotia e Barueri, Estado de São Paulo. Foram colhidas amostras de fezes de 220 cães recolhidos pelos CCZ das cidades referidas. A escolha dos cães foi realizada independentemente de raça, porte, idade ou sexo, levando-se em consideração o estado geral e a consistência das fezes que deveriam indicar ausência de diarreia.

A coleta de amostras de fezes foi feita no momento em que os animais apresentavam sinais clínicos de anestesia, antes de serem eutanasiados. Tal coleta foi realizada com o auxílio de suabe estéril introduzido profundamente ao intestino (porção retal), após os animais terem sido anestesiados.

Exames microbiológicos de amostras de fezes de cães

Os suabes foram encaminhados ao laboratório em condição de refrigeração, condicionados em geladeira portátil de isopor com gelo reciclável. No laboratório, foram submetidos aos exames microbiológicos que consistiram inicialmente no cultivo dos mesmos em caldo BHI (brain and heart infusion broth), ágar sangue de carneiro (5%) (blood agar base) e ágar

MacConkey (MacConkey agar) com incubação em aerobiose, a 37° C com leituras a 24-96h. As amostras também foram cultivadas em ágar Sabouraud-dextrose (Sabouraud dextrose agar) com incubação em aerobiose, mantidas em temperatura ambiente, por um período mínimo de 7 dias. As amostras incubadas em caldo BHI foram posteriormente semeadas em ágar sangue de carneiro (5%) e ágar MacConkey, sendo a incubação destas similar à descrita anteriormente para o cultivo inicial.

Os microrganismos isolados foram identificados de acordo com LENNETTE *et al.* (1985) e classificados segundo KREEGER-VAN-RIG (1984), KRIEG; HOLT (1994), FARMER III *et al.* (1999).

Pesquisa dos genes codificadores dos fatores de virulência de *E. coli*.

Como controles positivos para os diferentes genes pesquisados foi empregada amostra de *E. coli* enterotoxigênica e verotoxigênica pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Sanidade Suína-VPS-FMVZ-USP. Estas amostras foram previamente caracterizadas através de provas fenotípicas quanto à produção das toxinas STa, STb, LT e VT. As cepas de

E. coli uropatogênicas foram cedidas pelo Laboratório de Ornitopatologia – VPT/FMVZ-USP sendo previamente caracterizadas quanto à presença destes fatores por métodos fenotípicos.

Extração do DNA bacteriano

Para extração do DNA genômico as amostras foram cultivadas em infusão cérebro coração (BHI), a 37° C por 18h. Uma alíquota de 200µL da cultura foi submetida à extração de DNA através do método baseado na utilização de isothiocianato de guanidina descrito por BOOM *et al.* (1990). As amostras de DNA foram mantidas a -20° C até sua utilização na PCR.

Reação em cadeia da polimerase

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para os genes codificadores dos fatores de virulência estudados foram sintetizados pela Life Technologies (Miami) e são apresentados na Tabela 1. Foram realizadas duas combinações de primers para pesquisa dos genes. O primeiro multiplex consistiu da pesquisa dos genes para STa, STb, LT e VT1 e VT2, o segundo agrupou todos os fatores relacionados a amostras uropatogênicas.

Tabela 1 - "Primers" utilizados na PCR para amplificar fragmentos de diferentes genes para enterotoxinas (LT, STa e STb) e vero citotoxinas (VT1, VT2 e VT2e) e de diferentes genes para *pap*, *sfa*, *afa*, *hly*, *aer* e *cnf*.

Genes codificadores das toxinas	Nome do primer	Seqüência do oligonucleotídeo (5'→3')	Tamanho do produto amplificado	Referência
LT	LTA-1	GGCGACAGATTATACCGTGC	696 bp	SCHULTSZ <i>et al.</i> (1994)
	LTA-2	CCGAATTCTGTTATATATATGTC		
STa	STI-1	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG	147 bp	OLSVIK <i>et al.</i> (1993)
	STI-2	CTTGACTCTTCAAAAAGAGAAAATTAC		
STb	STb-1	ATCGCATTTCCTTCTGCATC	172 bp	BLANCO <i>et al.</i> (1997)
	STb-2	GGGCGCCAAAGCATGCTCC		
VT1	VT1-A	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130 bp	POLLARD <i>et al.</i> (1990)
	VT1-B	AGCGATGCAGCTATTAATAA		
VT2 hb ²	VT2-3	CCGTCAGGACTGTCTGAAAC	726 bp	WOODWARD <i>et al.</i> (1992)
	VT2-5	GAGTCTGACAGGCAACTGTC		
<i>Pap</i>	<i>pap-1</i>	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336 bp	YAMAMOTO <i>et al.</i> (1995)
	<i>pap-2</i>	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA		
<i>Hly</i>	<i>hly-1</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1.177 bp	YAMAMOTO <i>et al.</i> (1995)
	<i>hly-2</i>	ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA		
<i>Aer</i>	<i>aer-1</i>	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	602 bp	YAMAMOTO <i>et al.</i> (1995)
	<i>aer-2</i>	AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG		
<i>Cnf</i>	<i>cnf1</i>	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG	498 bp	YAMAMOTO <i>et al.</i> (1995)
	<i>cnf2</i>	CATTCAGAGTCCCTGCCCTCATTATT		
<i>Sfa</i>	<i>sfa-1</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410 bp	YAMAMOTO <i>et al.</i> (1995)
	<i>sfa-2</i>	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA		
<i>Afa</i>	<i>afa-1</i>	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACCTC	750 bp	YAMAMOTO <i>et al.</i> (1995)
	<i>afa-2</i>	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG		

A solução de amplificação padrão de PCR consistiu de 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, gelatina 0,001% (w/v), 200 μM de cada um dos desoxinucleosídeos trifosfatos, 20 pmoles da cada primer e 0,2 μL de Taq DNA polimerase, 5 μL da amostra de DNA e água até o volume final de 50 μL.

O programa utilizado para todas as reações consistiu de 1 ciclo a 95° C por 5min, 35 ciclos a 95° C por 1min, 55° C por 1min, 72° C por 1 min e um ciclo final de 72° C por 5min (Termociclador).

A cada amplificação realizada, foi adicionado um controle positivo contendo o DNA da *E. coli* positiva para o gene pesquisado e um controle negativo contendo os reagentes sem DNA.

Detecção do produto amplificado

Os produtos de PCR (10 μL) foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, a 4 volts/cm. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (10 μg/mL) e fotografado sob luz ultravioleta. Foi utilizado o marcador molecular 100 bp DNA ladder.

Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de Fisher, empregando-se o software GraphPad InStat 3.

RESULTADOS

Exames microbiológicos de amostras de fezes de cães errantes

Em 196 (89,09%) das 220 amostras de fezes, foram isoladas 120 (54,55%) estirpes de *E. coli* em cultura pura e 76 (34,54%) estirpes em associação com outros agentes, dentre outros microrganismos (Tabela 2). A frequência de isolamentos de *E. coli* (89,09% ou 196 amostras), considerando-se as amostras nas quais o agente foi isolado em cultura pura e também em associação com outros microrganismos, foi estatisticamente mais significativa ($P < 0,05$) do que as frequências de isolamentos de todos os outros microrganismos.

Tabela 2 - Frequência de ocorrência de microrganismos (bactérias e fungos) em cultura pura ou em associações, isolados a partir de 220 suabes retais de cães errantes.

Microrganismos isolados	N	%
<i>E. coli</i>	120	54,55*
<i>E. coli</i> / <i>Proteus mirabilis</i>	23	10,45
<i>E. coli</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	3,64
<i>E. coli</i> / <i>Edwardsiella tarda</i>	6	2,73
<i>E. coli</i> / <i>Proteus mirabilis</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	2,27
<i>E. coli</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Staphylococcus</i> sp.	4	1,82
<i>E. coli</i> / <i>Proteus mirabilis</i> / <i>Staphylococcus</i> sp.	4	1,82
<i>E. coli</i> / <i>Staphylococcus</i> sp.	4	1,82
<i>E. coli</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Streptococcus</i> sp.	2	0,91
<i>E. coli</i> / <i>Proteus mirabilis</i> / <i>Candida albicans</i>	2	0,91
<i>E. coli</i> / <i>Proteus mirabilis</i> / <i>Edwardsiella tarda</i>	2	0,91
<i>E. coli</i> / <i>Pseudomonas</i> sp.	2	0,91
<i>E. coli</i> / <i>Candida albicans</i>	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Candida albicans</i> / <i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Candida albicans</i>	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Staphylococcus</i> sp. / <i>Streptococcus</i> sp.	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Proteus mirabilis</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Salmonella</i> sp.	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Proteus mirabilis</i> / <i>Streptococcus</i> sp.	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Proteus vulgaris</i> / <i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Providencia</i> sp.	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Proteus vulgaris</i>	2	0,91
<i>E. coli</i> / <i>Staphylococcus</i> sp. / <i>Proteus vulgaris</i>	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Streptococcus</i> sp.	1	0,45
<i>E. coli</i> / <i>Streptococcus</i> sp. / <i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	0,45
<i>E. coli</i> / outros	76	34,54

Continua

Tabela 2 - Continuação.

Microrganismos isolados	N	%
<i>Proteus mirabilis</i>	6	2,73
<i>Proteus mirabilis</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	0,91
<i>Salmonella</i> sp.	2	0,91
<i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Providencia</i> sp.	1	0,45
<i>Proteus mirabilis</i> / <i>Edwardsiella tarda</i>	1	0,45
<i>Proteus mirabilis</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Staphylococcus</i> sp.	1	0,45
<i>Proteus mirabilis</i> / <i>Salmonella</i> sp. / <i>Streptococcus</i> sp.	1	0,45

*Verificou-se diferença estatisticamente ($P < 0,05$) significativa entre a ocorrência de *Escherichia coli* e os outros microrganismos isolados.

Tabela 3 - Frequência de ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *E. coli* em fezes de cães sem diarreia.

Fatores de Virulência	N	%
<i>afa</i>	16	8,16
<i>sfa</i>	54	27,55
<i>pap</i>	38	19,38
<i>aer</i>	66	33,67
<i>cnf</i>	31	15,81
<i>hly</i>	13	6,63
VT2	1	0,51

Legenda: pili associados com pielonefrite (*pap*); aerobactina (*aer*); fator necrotizante citotóxico (*cnf*); fimbria S (*sfa*); adesina afimbrial I (*afa*); hemolisina (*hly*); verotoxina 2 (VT2).

Pesquisa dos genes codificadores dos fatores de virulência de *E. coli* utilizando PCR

De um total de 196 estirpes de *E. coli* isoladas, 123 (62,75%) apresentaram um ou mais dos fatores de virulência estudados. Destas estirpes, 16 (8,16%) foram positivas para *afa*, 54 (27,55%) para *sfa*, 38 (19,38%) para *pap*, 66 (33,67%) para *aer*, 31 (15,81%) para *cnf*, 13 (6,63%) para *hly*, 1 (0,51%) para VT2 e nenhuma das linhagens foi positiva para LT, STa e STb (Tabela 3). Do total de linhagens estudadas, 61 (49,59%) apresentou mais de um tipo de fator de virulência.

Os fatores de virulência *aer* e *sfa* apresentaram frequência de ocorrência significativamente maior ($P < 0,05$) quando comparados com *afa*, *cnf*, *hly*, LT, STa, STb e VT. Por sua vez, *pap* apresentou frequência de ocorrência significativamente maior ($P < 0,05$) que *afa*, *hly*, LT, STa, STb e VT.

DISCUSSÃO

O isolamento de estirpes de *E. coli* em uma frequência de 89,09%, em cultura pura ou associação com

outros microrganismos, demonstrou a elevada ocorrência deste microrganismo em fezes de cães hígidos, a qual é estatisticamente ($P < 0,05$) maior do que dos outros agentes isolados. Segundo SANCAN *et al.* (2004), *E. coli* é um dos principais componentes da flora intestinal dos seres humanos e dos animais.

De acordo com BEUTIN (1999), estirpes de *E. coli* uropatogênicas isoladas da flora fecal e de infecções extra-intestinais de cães foram similares às linhagens uropatogênicas isoladas de humanos quanto aos seus atributos de virulência. Segundo este pesquisador, os cães devem apresentar um papel importante como reservatórios deste microrganismo para outros animais e para o homem, pois estudos indicam a transmissão de linhagens uropatogênicas fecais entre humanos e cães. Entretanto, pouco se conhece sobre o modo de transmissão das *E. coli* uropatogênicas entre os diferentes hospedeiros mamíferos.

No presente estudo foram identificados fatores de virulência em 62,75% das linhagens avaliadas. Os fatores de virulência detectados com maior frequência foram os genes *aer* (33,67%), *sfa* (27,55%) e *pap* (19,38%), os quais estão frequentemente associados a casos de infecções urinárias e/ou genitais humanas.

KURAZONO *et al.* (2003) apontaram a presença de genes *pap*, *sfa*, *afa*, *hly*, *aer* e *cnf* em estirpes de *E. coli* isoladas de fezes normais e urina de cães. Por sua vez, FÉRIA *et al.* (2000) detectaram diferentes fatores de virulência em estirpes isoladas de infecção do trato urinário de humanos, cães e gatos, sendo que aerobactina (*aer*) apresentou a maior frequência entre os gatos, hemolisina (*hly*) entre os humanos e pili associados a pielonefrite (*pap*) entre os cães, sugerindo uma adaptação de *E. coli* uropatogênica aos receptores celulares de cada hospedeiro. No presente estudo por sua vez, os fatores de virulência encontrados com maior frequência foram *aer*, *sfa* e *pap*, embora também tenham sido verificados, em frequência inferior, a hemolisina (*hly*) e fator citotóxico necrotizante (*cnf*).

Yuri *et al.* (1998) verificaram a presença de fatores de virulência, incluindo pili associados com pielonefrite (*pap*), fimbria S (*sfa*), adesina afimbrial (*afa I*), alfa hemolisina (*hly*), fator citotóxico necrotizante 1 (*cnf 1*) e aerobactina (*aer*) em estirpes isoladas de urina de cães e gatos com UTI e fezes de animais hígidos. Estes fatores de virulência também são encontrados em estirpes isoladas de humanos. As linhagens isoladas de humanos e cães com UTI possuem maior quantidade de fatores de virulência do que aquelas encontradas em humanos e cães saudáveis.

Tendo em vista que *Escherichia coli* é um dos mais freqüentes agentes causais de infecções do trato urinário de humanos, tanto quanto de cães e gatos, é importante o seu conhecimento, particularmente quando se considera o convívio próximo entre estas espécies. No presente estudo, os fatores de virulência mais encontrados foram uropatogênicos (*aer*, *sfa* e *pap*) concordando com as observações de YURI *et al.* (1998), embora os animais estudados fossem cães errantes e não apresentassem sinais clínicos de UTI. LOW *et al.* (1988) estudaram *E. coli* isoladas do reto e do trato urinário de cães com infecção urinária e concluíram que os isolados de urina poderiam ser de origem intestinal. Em mulheres, a microbiota fecal é reconhecida como reservatório de microrganismos potencialmente causadores de infecções bacterianas do trato urinário (WADAS, 1996).

Estudo realizado por JOHNSON *et al.* (2001) apontou semelhanças entre amostras de ExPEC (*E. coli* Patogênica Extraintestinal) humana e canina com relação aos fatores de virulência, baseado no polimorfismo genético, mas não comprovou a transmissão cruzada entre as espécies ou excluiu a possibilidade de humanos e caninos adquirirem o mesmo tipo de *E. coli* de origem externa comum.

O cão errante poderia estar contaminando o meio ambiente e expondo o ser humano a enterites por *E. coli* e até mesmo outras manifestações de colibacilose, através do risco de contaminação de mananciais ou pelo contato direto que pessoas poderiam vir a ter com estes animais os quais, desta forma, atuariam como fontes de infecção na ocorrência de colibacilose humana (BLANCO *et al.*, 1997; KRUTH, 1998; FARMER III, 1999).

Os cães errantes aparentemente saudáveis, sem sintomas de colibacilose, poderiam estar participando da cadeia epidemiológica como reservatórios de *E. coli* (microrganismo isolado com maior freqüência das fezes destes animais) de natureza uropatogênica ao homem, pois os genes detectados em maior freqüência foram *aer*, *sfa* e *pap*, presentes em linhagens associadas a infecções extraintestinais, mais especificamente infecções urinárias. Deve-se proceder à realização de mais

estudos que visem à identificação do modo como pode ocorrer a transmissão deste agente entre cães e humanos, o que possibilitaria o desenvolvimento de mecanismos de prevenção da doença.

REFERÊNCIAS

- BEUTIN, L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Veterinary Research*, v.30, p.285-298, 1999.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; GONZALEZ, E.A.; MORA, A.; JANSEN, W.; GOMES, T.A.T.; ZERBINI, F.; YANO, T.; PESTANA DE CASTRO, L.; BLANCO, J. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, p.2958-2963, 1997.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIN-VAN DILEN, P.M.E.; NOORDAA VAN DER J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, p.495-503, 1990.
- CHEN, Y. M. M.; WRIGHT, P. J.; LEE, C. S.; BROWNING, G. L. Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. *Veterinary Microbiology*, v.94, p.57-69, 2003.
- DONNENBERG, M.S.; WHITTAM, T.S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *The Journal of Clinical Investigation*, v.107, p.539-548, 2001.
- DROLET, R.; FAIRBROTHER, J.M.; HAREL, J.; HÉLIE, P. Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog. *Canadian Journal Veterinary Research*, v.58, p.87-92, 1994.
- FARMER III, J.J. *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; FALLER, M.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. (Eds.). *Manual of clinical microbiology*. 7.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. cap.27, p.442-455.
- FÉRIA, C.P.; CORREIA, J.D.; GONÇALVES, J.; MACHADO, J. Detection of virulence factors in Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from humans, dogs and cats in Portugal. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.485, p.305-308, 2000.
- GUTH, B.E.C.; RAMOS, S.R.T.S.; CERQUEIRA, A.M.F.; ANDRADE, J.R.C.; GOMES, T.A.T. Phenotypic and genotypic characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. *Membro do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, n.8, p.1085-1089, 2002.
- JOHNSON, J.R.; MOSELEY, S.L.; ROBERTS, P.L.; STAMM, W.E. Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: Association with patients characteristics. *Infection and Immunity*, v.56, p.405-412, 1988.
- JOHNSON, J.; SIELL, A.L.; DELAVARI, P. Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v.69, n.3, p.1306-1314, 2001.
- KEGER-VAN-RIG, N.J.N. *The yeats a taxonomic study*. 3.ed. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1984.

- KRIEG, N.R.; HOLT, J.C. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9.ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994. 894p.
- KRUTH, S. A.. Gram negative bacterial infections. In: GREENE, C.E. (Ed.). *Infections diseases of dog and cat*. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p.217-222.
- KURAZONO, H.; NAKANO, M.; YAMAMOTO, S.; OGAWA, O.; YURI, K.; NAKATA, K.; KIMURA, M.; MAKINO, S.; NAIR, G.B. Distribution of the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from companion animals and correlation with serotypes and size-variations of the pathogenicity island. *Microbiology and Immunology*, v.47, p.797-802, 2003.
- LENNETE, E.H.; HANSLER JUNIOR, W.J.; SHADOMY, H.J. *Manual of clinical microbiology*. 4.ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 1985. 1149p.
- LOW, D.A.; BRAATEN, B.A.; LING, G.V.; JOHNSON, D.L.; RUGY, A.L. Isolation and comparation of *Escherichia coli* strains from canine and human patients with urinary tract infections. *Infection Immunology*, v.56, p. 2601-2609, 1988.
- OLSVIK, O.J. WAHLBERG, B. PETTERSON, M. UHLEN, T. POPOVIC, I. K. WACHSMUTH, AND P.I. HELDS. Use of automated sequencing of polimerase chain reation-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.1, p.22-25, 1993.
- POLLARD, D.R.; JOHNSON, H.L.; LIOR, H.; TYLER, S.D.; ROZEE, K.R. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, p.540-545, 1990.
- RIBEIRO, M.G. *Fatores de virulência em linhagens de E.coli isoladas de mastite bovina clínica e sub-clínica*. 2001. 70f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental aplicada as Zoonoses e Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- SANCAK, A.A.; RUTGERS, H.C.; HART, C.A.; BATT, R.M. Prevalence oh enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea. *The Veterinary Record*, v.154, p.101-106, 2004.
- SANNES, M.R.; KUSKOWSKI, M.A.; JOHNSON, J.R.. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains isolated from urine of women with cystitis or pyelonephritis and feces of dogs and healthy humans. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.225, n.3, p.368-373, 2004.
- SAYLERS, A.A; WHITT, D.D. *Escherichia coli* Gastrointestinal Infections. In____. *Bacterial Pathogenesis: a molecular approach*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994. chap.16., p.190- 212.
- SAYLERS, A.A; WHITT, D.D. *Escherichia coli* Urinary Tract Infections. In____. *Bacterial Pathogenesis: a molecular approach*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994. chap. 17., p.205- 212.
- SCHULTZ C.; POOL, G.J.; VAN KETEL, R.; DE WEVER, B.; SPEELMAN, P.; DANKERT, J. Detection of enterotoxigenic *E. coli* in stool samples by using nonradiatioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, p.2393-2397, 1994.
- SEARS, C.L.; KAPER, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiology Reviews*, v.60, p.167-215, 1996.
- STONE, G.G., OBERST, R.D., HAYS, M.P., VEY, S.Mc, CHENGAPPA, M.M. Detection of salmonella serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation - PCR procedure. *Journal of Microbiology*, v.32, p.1742-1749, 1994.
- SUSSMAN, M. (Ed.). *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 639p.
- TRABULSI, L.R.; CAMPOS, L.C. *Escherichia*. In: TRABULSI, L.S; SOUZA, C.P. (Eds.). *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, 1999. Cap. 28. p.215-228.
- WADAS, B.; UHNN, I.; LAGERSTEDT, A.S.; JONSSON, P. Biochemical phenotypes of *Escherichia coli* in dogs: comparison of isolates isolated from bitchessuffering from pyometra and urinary infection with isolates from faeces of healthy dogs. *Veterinary Microbiology*, v.52, p.293-300, 1996.
- WOODWARD, M.J.; CARROLL, P.J.; WRAY, C. Detection of entero- and verocyto-toxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, v.31, p.251-261, 1992.
- YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; ITO, I. A case of hemolytic uremic syndrome associated shiga toxin 2 -producing *Escherichia coli* O121 infection caused by drinking water contaminated with bovine feces. *Japanese Journal Infection Disease*, v.55, p.174-176, 2002.
- YURI, K.; NAKATA, K.; KATAE, H.; YAMAMOTO, S.; HASEGAWA, A. Distribution of uropathogenic virulence factors among *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.60, n.3, p.287-290, 1998.
- YURI, K.; NAKATA, K.; KATAE, H.; TSOKAMOTO, T.; HASEGAWA, A. Serotypes and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.61, n.1, p.37-40, 1998.

Recebido em 24/5/06

Aceito em 29/10/06