

Carolina Pantuzza Ramos

Patotipos diarreogênicos e filogrupos de *Escherichia coli* isolada em fezes de cães e répteis não diarreicos

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Silveira Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Morcatti Coura

UFMG – Escola de Veterinária

Belo Horizonte

2019

R175p

Ramos, Carolina Pantuzza, 1992-

Patotipos diarreogênicos e filogrupos de *Escherichia coli* isolada em fezes de cães e répteis não diarreicos / Carolina Pantuzza Ramos. – 2019.

84 p. : il.

Orientador: Rodrigo Otávio Silveira Silva

Coorientadora: Fernanda Morcatti Coura

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Teses. 2. Réptil – Doenças – Teses. 3. Diarreia em animais – Teses.
4. *Escherichia coli* – Teses. I. Silva, Rodrigo Otávio Silveira. II. Coura, Fernanda Morcatti.
III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.708 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

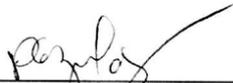
CAROLINA PANTUZZA RAMOS

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA .

Aprovada em 14 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Rodrigo Otávio Silveira Silva
Presidente - Orientador



Profª. Paula Prazeres Magalhães
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG



Profª. Marcelo Pires Nogueira de Carvalho
Escola de Veterinária - UFMG

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à ciência, agente de transformação que muito me instiga.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, sempre confiantes em meus passos, por me proporcionarem todo o suporte e apoio necessários para minha caminhada até aqui. O que sou hoje, meu irmão, eu também devo muito a você.

Ao meu amado esposo Bruno, pela paciência durante os percalços e por ser uma das pessoas que mais me estimulou a seguir essa trajetória.

Aos queridos amigos e familiares, em especial Clarissa, André, Isabella e Flávia. O apoio de vocês é muito importante para mim.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e principalmente ao Laboratório de Anaeróbios / Bacterioses e Pesquisa, pela confiança e acolhimento que resultaram não somente a elaboração desse trabalho, mas também meu amadurecimento e realização de um sonho. Professores Rodrigo e Francisco, grandes exemplos de integridade e profissionalismo, eu sou imensamente grata a vocês.

Aos amigos e colegas Jordana, Rafael, Amanda, Carlos, Flávia, Emily, Diogo, Letícia, Samya e Ronnie, por deixarem o ambiente sempre tão leve e descontraído, tornando o trabalho mais fácil e prazeroso.

À professora Fernanda Coura, por todo auxílio e paciência na execução e análise dos experimentos. Jonata, você também foi essencial para a elaboração desse trabalho!

Aos queridos colegas do LBA, em especial Ethiene, Jonata e Dionei, pela parceria e apoio quando mais precisei.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, cuja excelência possibilitou a execução desse e de diversos outros estudos, graças à grande dedicação de seus coordenadores e funcionários.

Às instituições de apoio e fomento a pesquisa, CNPq, CAPES, FAPEMIG e PRPq, por possibilitarem a realização dos experimentos.

Por ter aceito o convite de avaliação do presente trabalho, agradeço imensamente à banca examinadora.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Ricardo Reis

SUMÁRIO

SUMÁRIO	7
RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO GERAL	13
OBJETIVOS	14
OBJETIVO GERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
1. REVISÃO DE LITERATURA: PATOTIPOS E FILOGRUPOS DE <i>Escherichia coli</i> CAUSADORES DE DIARREIA EM ANIMAIS E SERES HUMANOS	15
1.1 PATOTIPOS DE <i>Escherichia coli</i> CAUSADORES DE DIARREIA.....	22
1.1.1 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC).....	22
1.1.2 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	25
1.1.3 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC) e <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC).....	28
1.1.4 <i>Escherichia coli</i> necrotoxigênica (NTEC).....	30
1.1.5 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	33
1.1.6 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	34
1.1.7 <i>Escherichia coli</i> difusamente aderente (DAEC).....	36
1.2 PATOTIPOS E FILOGRUPOS DE <i>E. coli</i> EM CÃES E RÉPTEIS.....	38
1.3 COMENTÁRIOS FINAIS.....	39
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
2. CAPÍTULO UM: CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE <i>E. coli</i> ISOLADAS DE FEZES DE CÃES ALIMENTADOS COM RAÇÃO E COM DIETA CASEIRA ..	48
2.1 RESUMO.....	48
2.2 INTRODUÇÃO.....	48
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.3.1 Coleta de amostras.....	50
2.3.2 Isolamento, identificação e tipagem filogenética de <i>E. coli</i>	50
2.3.3 Detecção de genes de patogenicidade e caracterização de patótipos de <i>E. coli</i>	52

2.3.4 Análises estatísticas.....	53
2.4 RESULTADOS.....	54
2.5 DISCUSSÃO.....	58
2.6 CONCLUSÕES.....	60
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
3. CAPÍTULO DOIS: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE <i>E. coli</i> DE RÉPTEIS.....	69
3.1 RESUMO.....	69
3.2 INTRODUÇÃO.....	69
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	70
3.3.1 Amostras clínicas.....	70
3.3.2 Isolamento, identificação e tipagem filogenética de <i>E. coli</i>	72
3.3.3 Identificação de genes de patogenicidade e caracterização de patotipos de <i>E. coli</i>	72
3.3.4 Análises estatísticas.....	72
3.4 RESULTADOS.....	72
3.5 DISCUSSÃO.....	74
3.6 CONCLUSÕES.....	76
3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
4. ANEXOS.....	81
4.1 TABELAS.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Principais adesinas e toxinas de patotipos de <i>E. coli</i> causadores de diarreia em humanos e/ou animais.....	18
Tabela 1.2. Principais adesinas, enterotoxinas e sorogrupos de ETEC associadas a colibacilose em diferentes espécies hospedeiras.....	23
Tabela 1.3. Sorogrupos de <i>E. coli</i> Enteropatogênica (EPEC) comumente isolados de bovinos, suínos, cães e seres humanos.....	26
Tabela 2.1. Relação do número de cães alimentados a base de ração e dieta caseira crua e cozida.	50

Tabela 2.2. Tabela de interpretação dos possíveis resultados e reações adicionais após realização de PCR quadruplex dos isolados geneticamente identificados como <i>E. coli</i>	52
Tabela 2.3. Relação do número de cães amostrados, de cães positivos para <i>E. coli</i> nas fezes, e de estirpes de <i>E. coli</i> identificadas de acordo com o tipo de alimentação fornecida aos cães.....	54
Tabela 2.4. Relação do número de amostras e grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> isoladas de cães alimentados com dieta crua, cozida e com ração. Diferentes letras em uma mesma linha significam taxas de eliminação de <i>E. coli</i> estatisticamente diferentes aos Testes Exato de Fisher e Qui-quadrado.....	55
Tabela 2.5. Variáveis com valores de $p \leq 0,02$ ao Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher submetidas ao modelo de regressão logística. Diferentes letras em uma mesma linha simbolizam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).....	57
Tabela 3.1. Relação de répteis amostrados conforme o grupo taxonômico, habitat e dieta.....	71
Tabela 3.2. Frequência de isolamento de <i>E. coli</i> em répteis do Brasil e grupos filogenéticos identificados nos isolados dos animais	73
Tabela 3.3. Frequência de isolamento de <i>E. coli</i> em répteis de diferentes hábitos alimentares e habitats.....	73
Tabela 3.4. Relação de animais positivos para o gene codificador de CNF1 de acordo com o filogrupo, hábitos alimentares, habitat, subordem e espécie do hospedeiro positivo.	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Representação esquemática de características das diarreias em seres humanos e animais, de acordo com a sua duração, mecanismos fisiopatológicos e origem etiológica. Adaptado de BLASER; DEANE; FRUHWALD (2015).....	16
Figura 1.2. Representação esquemática dos mecanismos de interação entre os diferentes patotipos diarreio gênicos de <i>E. coli</i> e as células do epitélio intestinal. a. <i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC) – indução da lesão denominada <i>attaching and effacing</i> (A/E). (1) Adesão ao enterócito, (2) Translocação proteica por sistema de secreção do tipo III, (3) alteração do citoesqueleto e destruição das microvilosidades. b. <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC) – indução da lesão A/E adicionalmente à produção das toxinas Shiga (Stx), que são absorvidas e dão origem a complicações sistêmicas. c. <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC) – Aderência a receptores específicos dos enterócitos, com produção de toxinas termoestáveis (ST) e/ou termolábeis (LT). d. <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC) – adesão aos enterócitos e agregação dos microrganismos, com formação de um espesso biofilme e produção de toxinas como EAST1 e Pet. e. EIEC – invasão dos enterócitos por lise do fagolisossoma e movimentação para células adjacentes com o auxílio de microfilamentos de actina. f. <i>E. coli</i> difusamente aderente (DAEC) – aderência a receptores dos enterócitos, como o DAF, e indução do crescimento de projeções celulares que envolvem as bactérias. Imagem adaptada de KAPER et al. (2004).....	19

Figura 1.3. Relação entre os seis grupos filogenéticos identificados por MLST em estirpes da coleção de *E. coli* de referência (ECOR) e outras estirpes de referência em comparação com *E. fergusonii*. Imagem adaptada de TENAILLON et al. (2010).....21

Figura 2.1. Genes de patogenicidade e patotipos identificados em amostras de *E. coli* isoladas das fezes de cães alimentados com dieta crua, cozida e a base de ração. *As estirpes carreadoras de genes que codificam fatores de patogenicidade pertencentes a mais de um patotipo de *E. coli* foram classificadas como recombinantes. **Amostras positivas apenas para o gene codificador da toxina EAST1.....56

RESUMO

Estirpes diarreio gênicas de *E. coli* podem ser classificadas em diferentes patotipos conforme a presença de determinados fatores de patogenicidade, o que torna esse agente potencialmente patogênico aos animais e seres humanos. A identificação de animais carreadores desse enteropatôgeno é de extrema importância para a prevenção e controle da ocorrência de infecções por *E. coli* em hospedeiros susceptíveis, incluindo os seres humanos. O presente trabalho teve como objetivo o isolamento de *E. coli* a partir de amostras fecais coletadas de cães não diarreicos alimentados com dietas caseiras e ração e de répteis de diferentes habitats, bem como a caracterização dos isolados em grupos filogenéticos e patotipos diarreio gênicos, de acordo com a presença de importantes genes de patogenicidade. Foram isoladas 246 estirpes de *E. coli* das fezes de 106 cães amostrados, sendo os filogrupos B1 e B2 mais comuns em isolados de cães alimentados com ração convencionais (60,4%), com uma propensão ao isolamento de estirpes B2 por esses animais ($p = 0,0004$). Já os grupos B1 e E foram mais comuns em isolados de cães que se alimentavam de dietas não comerciais (33,9% e 18,7%, respectivamente), sendo o isolamento de estirpes do grupo E maior em cães que ingeriam carnes cruas ($p = 0,009$). A análise multivariada indicou que cães que ingeriam dietas baseada em carne crua apresentaram frequências maiores de isolados carreadores de genes de patogenicidade, bem como maior frequência dos genes de CNF-1, intimina e do filogrupo E quando comparados com os isolados de cães alimentados por dietas caseiras cozidas e ração. Dos 76 répteis amostrados, 52 foram positivos para *E. coli*, com o isolamento de 88 estirpes do agente. A detecção de *E. coli* foi significativamente maior em amostras clínicas de serpentes e outros répteis carnívoros ($p \leq 0,05$). A maior parte dos isolados foram positivos para o grupo filogenético B1, sendo aproximadamente 89% dos animais, principalmente serpentes e lagartos, carreadores de isolados apenas desse grupo. Dois répteis foram positivos para isolados carreadores do gene de patogenicidade EAST-1, sendo um deles um animal domiciliado e outro réptil de vida livre. O gene codificador de CNF-1 foi encontrado em 13 isolados de sete répteis, dos quais dois eram quelônios domiciliados. A maior identificação de importantes genes de patogenicidade em isolados de *E. coli* de cães alimentados por carnes cruas, bem como a detecção de estirpes potencialmente patogênicas em amostras clínicas de répteis, sugerem o papel desses grupos de animais como possíveis reservatórios de *E. coli* patogênica. Dessa forma, o contato de seres humanos com esses animais, que podem ser reservatórios de estirpes positivas para os genes de CNF1, intimina e EAST1, possivelmente representa um maior risco às pessoas de se exporem aos agentes patogênicos. Adicionalmente, o presente trabalho reforça a hipótese que fatores como dieta e habitat podem influenciar na frequência de isolamento e distribuição de determinados grupos filogenéticos e patotipos de *E. coli*

Palavras chave: Dieta baseada em carne crua, grupo filogenético, *E. coli* diarreio gênica

ABSTRACT

Diarrheogenic *E. coli* could be classified in different pathovars according to specific pathogenic factors which makes this agent potentially pathogenic for humans and animals. It is widely important to identify animals carriers of *E. coli* to prevent and control infections in susceptible hosts, including humans. Thus, the present study aimed to isolate *E. coli* in clinical samples of non-diarrheic dogs that fed unconventional diets and dry food and reptiles from different living conditions, as well as to characterize the isolated strains in phylogenetic groups and pathovars of diarrheogenic *E. coli* according to pathogenic genes detection. 246 *E. coli* were isolated from 106 sampled dogs, being the phylogenetic groups B1 and B2 more common in dogs that ate dry food (60.4%) additionally to a propensity to isolate B2 strains by these animals ($p = 0.0004$). The phylogroups B1 and E were the most commonly isolated strains in dogs fed with unconventional diets (33.9% and 18.7%, respectively), being the isolation of group E higher in dogs fed with raw diets ($p = 0,009$). Dogs that fed raw food diets had a frequency of *E. coli* positive for pathogenic genes carriage, genes of CNF-1, intimin and group E statistically higher than dogs fed with cooked diet and dry food at multivariate analysis. Of 76 sampled reptiles, 52 were positive for *E. coli* with 88 isolated strains. The identification of *E. coli* was significantly higher in clinical samples of snakes and other canivore reptiles ($p \leq 0,05$). Most of isolates were positive for phylogroup B1, with approximately 89% of animals, mainly snakes and lizards, carrying only these group of *E. coli*. Two reptiles were positive for *E. coli* that carried the pathogenic gene for EAST-1, of which one was domesticated and another a wildlife reptile. The encoding gene of CNF-1 was found in 13 isolates of seven reptiles, of which two were domesticated chelonians. A higher identification of important pathogenic genes of *E. coli* in isolates of dogs that fed unconventional raw diets, as well as the detection of potentially pathogenic strains in clinical samples of reptiles suggests the role of these animals as possible reservoirs of pathogenic *E. coli*. Thus, the human' contact with these animals that could be reservoirs of CNF1, intimin and EAST1 positive strains may represents a greater risk to people of exposure to pathogenic agents. Additionally, the present work reinforces the hypothesis that factors as diet and geographic origin could influence in the frequency of isolation and distribution of some phylogenetic groups and *E. coli* pathovars

Key words: Raw meat-based diets, phylogenetic groups, diarrheogenic *E.coli*

INTRODUÇÃO GERAL

Escherichia coli compõe a microbiota indígena do trato intestinal de seres humanos e animais, sendo potencialmente diarreiogênica quando associada à presença de fatores de patogenicidade específicos. De acordo com a presença destes fatores de patogenicidade, as estirpes de *E. coli* causadoras de diarreia são classificadas em diferentes patotipos responsáveis por distintos mecanismos de patogenicidade em seus hospedeiros.

O potencial patogênico de isolados de *E. coli* obtidos de diferentes hospedeiros, associado a alta ocorrência de colibacilose em animais e seres humanos em diversos países, destaca esse microrganismo como um dos mais importantes agentes infecciosos causadores de diarreia no mundo. Assim, a investigação de diferentes fontes de transmissão, principalmente aos seres humanos, torna-se de extrema valia para a prevenção da ocorrência de novos casos e as consequências associadas à doença.

Apesar da grande importância de *E. coli* como um patógeno de animais e seres humanos, pouco se sabe quanto ao papel de determinados grupos de animais, especialmente cães alimentados com dietas caseiras e répteis domiciliados, como possíveis reservatórios de *E. coli* diarreiogênicas. Adicionalmente, é desconhecida a diversidade genética dos isolados de cães alimentados com diferentes tipos de dieta, e existem poucos trabalhos relacionados a genotipificação de isolados de répteis. Portanto, é de grande importância a realização de estudos que visem a avaliação de amostras clínicas de animais assintomáticos em estreito contato com seres humanos, para, assim, ser possível estabelecer os possíveis riscos que esses animais podem oferecer aos seus tutores e eventualmente à própria espécie.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de genes codificadores de fatores de patogenicidade de *E. coli* diarreio gênica isoladas de cães e répteis e realizar a caracterização filogenética destes isolados obtidos dos diferentes grupos de animais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar estirpes de *E. coli* isoladas das fezes de cães alimentados com dietas caseiras cruas, cozidas e ração em patotipos diarreio gênicos e grupos filogenéticos através de ensaios de PCR.
2. Caracterizar estirpes de *E. coli* isoladas do conteúdo intestinal de répteis de vida livre, domiciliados e que viviam em cativeiro em patotipos diarreio gênicos e grupos filogenéticos a partir de ensaios de PCR.

1. REVISÃO DE LITERATURA: PATOTIPOS E FILOGRUPOS DE *Escherichia coli* CAUSADORES DE DIARREIA EM ANIMAIS E SERES HUMANOS

Considerada uma manifestação clínica de doenças gastrintestinais, a diarreia pode resultar em sérias consequências à saúde de seres humanos e animais, como desidratação, desequilíbrio de eletrólitos, acidose metabólica e até morte (BLASER; DEANE; FRUHWALD, 2015; SABOL; CARLSON, 2007). Síndrome muito frequente em seres humanos, a diarreia causa a mortalidade de milhões de pessoas anualmente e é um dos principais motivos de mortalidade infantil, sendo responsável por impactos socioeconômicos significativos (CROXEN et al., 2013; ZAMBRANO et al., 2014). A síndrome diarreica ocorre também com grande frequência em animais de produção e de companhia, especialmente os mais jovens, resultando em consideráveis perdas produtivas e mortalidade animal (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; HUBBARD et al., 2007; MAGDESIAN, 2005). Dentre os fatores de risco associados a ocorrência de diarreia em seres humanos, destacam-se o convívio com animais domésticos, contato com pessoas diarreicas, má nutrição, nível socioeconômico, idade, uso de antimicrobianos e alimentação (BLASER; DEANE; FRUHWALD, 2015; ETHELBERG et al., 2006; ZAMBRANO et al., 2014). Em animais, fatores como a idade, alimentação, densidade animal, condições de higiene, imunidade e sazonalidade foram descritos como influenciadores do desenvolvimento das doenças entéricas (KLEIN-JÖBSTL; IWERSSEN; DRILLICH, 2014; SÆVIK; SKANCKE; TRANGERUD, 2012)

Classificada conforme a duração e mecanismos fisiopatológicos que a originam, a diarreia pode ser causada por doenças infecciosas ou não-infecciosas (Figura 1.1) (BLASER; DEANE; FRUHWALD, 2015; SABOL; CARLSON, 2007). Dentre as causas de diarreia de origem bacteriana em animais e seres humanos, destacam-se as infecções causadas por *Escherichia coli*, bacilo gram-negativo da família Enterobacteriaceae e anaeróbio facultativo mais abundante da microbiota intestinal dos mamíferos e outras espécies animais (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012; GYLES; FAIRBROTHER, 2010; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Reconhecida como uma bactéria que naturalmente coloniza o trato intestinal de neonatos poucas horas após o nascimento, principalmente o intestino grosso, *E. coli* raramente oferece riscos aos seus hospedeiros, podendo, contrariamente, prevenir a colonização de patógenos na mucosa (TENAILLON et al., 2010). Todavia, determinados clones de *E. coli*, que ocorrem em menor número, são capazes de adquirir e expressar genes de patogenicidade, podendo adequar-se a diferentes nichos e tornar-se patogênicos aos seus hospedeiros (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998).

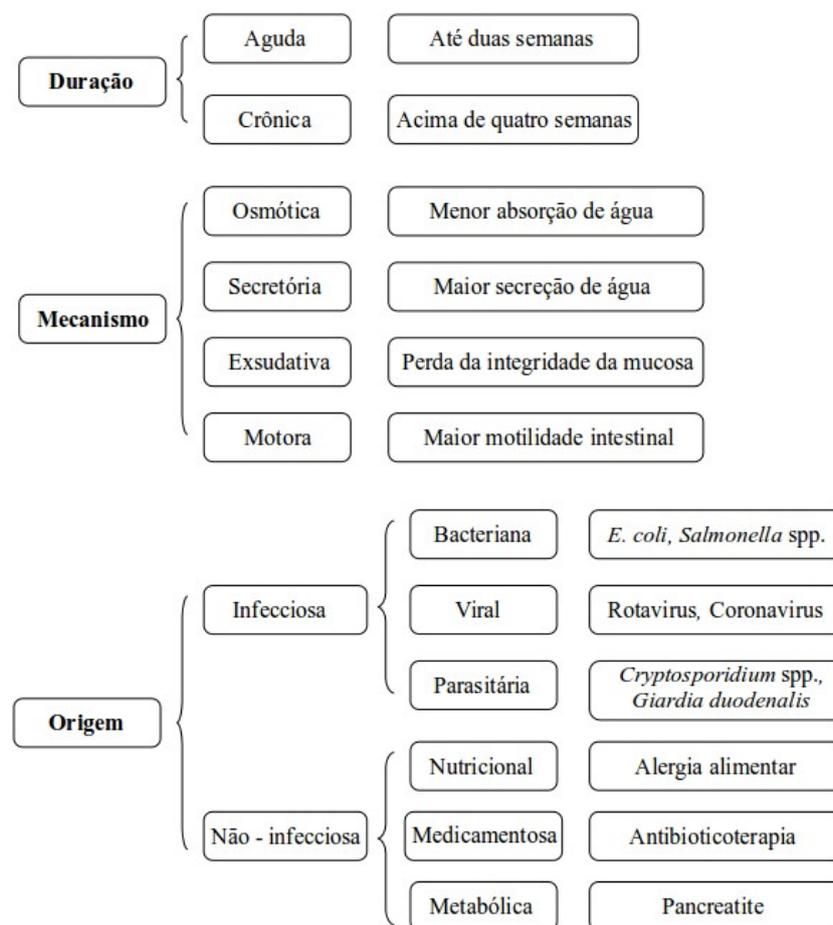


Figura 1.1. Representação esquemática de características das diarreias em seres humanos e animais, de acordo com a sua duração, mecanismos fisiopatológicos e origem etiológica. Adaptado de BLASER; DEANE; FRUHWALD (2015).

A combinação de diferentes fatores de patogenicidade produzidos por estirpes de *E. coli* permitem a sua caracterização em patotipos ou patovares específicos, sintetizados a partir de genes geralmente codificados em fragmentos genéticos móveis, como ilhas de patogenicidade, plasmídeos de virulência ou transferidos entre cepas por bacteriófagos (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; CROXEN et al., 2013; GYLES; FAIRBROTHER, 2010; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Assim como outros patógenos de mucosa, *E. coli* patogênica é capaz de colonizar a mucosa, evadir o sistema de defesa do hospedeiro, multiplicar-se e causar danos ao hospedeiro. A produção de fatores de patogenicidade como adesinas e toxinas pelos diferentes patotipos, definem os mecanismos características das doenças entéricas causadas por *E. coli* (Tabela 1.1). A presença de determinadas adesinas, fimbriais ou não, tornam as estirpes diarreio gênicas de *E. coli* capazes de colonizarem diferentes sítios da mucosa intestinal de seus hospedeiros, geralmente não colonizados por cepas comensais. Estirpes diarreio gênicas de *E. coli* podem produzir, ainda, diversos tipos de toxinas, que interagem e danificam os enterócitos

de diferentes formas (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Surtos de diarreia por estirpes patogênicas de *E. coli* são frequentes em medicina humana e veterinária, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade (CROXEN et al., 2013; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Para que seja confirmada a causa de diarreia por *E. coli*, é importante que a identificação da presença de estirpes patogênicas ou patotipos seja realizada. Esse procedimento é útil, ainda, para o entendimento do processo de interação do agente com o hospedeiro e o surgimento da doença, além do reconhecimento de indivíduos carreadores do agente (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Anteriormente, as estirpes patogênicas eram identificadas por meio de sorotipagem baseada na determinação de sorogrupos e sorotipos a partir da identificação dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K). Posteriormente, com a caracterização da estrutura molecular dos antígenos de superfície, os antígenos fimbriais, antes classificados como capsulares, foram designados como antígeno F (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; ORSKOV et al., 1982). São identificados, aproximadamente, 200 sorotipos O, 56 H, 22 F e 60 K (DUBREUIL, 2017). Apesar de determinados sorogrupos estarem associados a algumas síndromes clínicas, podendo correlacionar-se a patotipos de *E. coli*, esse tipo de classificação não é o suficiente para a caracterização de uma estirpe como diarreio gênica, tendo em vista que a presença de antígenos de superfície por si só não confere virulência à estirpe. Dessa forma, métodos mais acessíveis e menos laboriosos, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), têm sido utilizados para a identificação de determinantes de virulência, possibilitando assim uma caracterização mais fidedigna de estirpes diarreio gênicas de *E. coli* e a sua classificação em patotipos (CROXEN et al., 2013; GYLES; FAIRBROTHER, 2010; NATARO; KAPER, 1998)

Diferentes patotipos de *E. coli* podem causar diarreia em animais e seres humanos, dos quais a maior parte compartilha fatores de patogenicidade em comum para ambos hospedeiros. Porém, existem exceções, como *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), cujos fatores de colonização ligam-se, em sua maioria, a receptores da superfície dos enterócitos específicos a cada espécie hospedeira (BEUTIN, 1999). Dessa forma, ETEC não é considerada uma estirpe zoonótica, diferentemente de *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que podem representar riscos à saúde humana quando identificados em animais (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Além dos patotipos descritos anteriormente que são importantes causadores de infecções entéricas em seres humanos e animais, existem outros cuja frequência e potencial patogênico para os animais não estão bem caracterizados, apresentando assim maior relevância para os seres humanos. Esses patotipos correspondem a *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* necrotoxigênica (NTEC), e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (CROXEN et al., 2013; NATARO; KAPER, 1998).(Tabela 1.1)

Tabela 1.1. Principais adesinas e toxinas dos principais patótipos de *E. coli* causadores de diarreia em seres humanos e/ou animais.

Patotipo	Fatores de patogenicidade	
	Adesina	Toxina
ETEC	K99 (F5), F41, K88 (F4), F18, 987P, CFA-I, CS1 a CS6	STa, STb, LT, EAST1
EPEC	Intimina, Bfp, Iha, Efa, ToxB	Ausente
STEC	Iha, Efa, ToxB, Saa, F18, Lpf	Stx1, Stx2, EhxA
EHEC	Intimina, Iha, Efa, ToxB, Lpf	Stx1, Stx2, EhxA
NTEC	AfaVIII, S, P, H, F17	CNF1, CNF2, Hly, CDT
EIEC	IpaB	ShET2
EAEC	AAF, Tipo IV, Hda	EAST1, Pet, ShET1
DAEC	AfaI, Dr, F1845, AIDA-I	Desconhecido

São descritos três principais mecanismos pelos quais *E. coli* pode causar diarreia, sendo: (i) produção de enterotoxinas (ETEC e EAEC), (ii) invasão (EIEC), e/ou (iii) aderência íntima com alteração de membrana (EPEC e EHEC) (NATARO; KAPER, 1998). Alguns processos de interação dos microrganismos com a mucosa intestinal, específicos para cada patótipo, foram ilustrados na Figura 1.2.

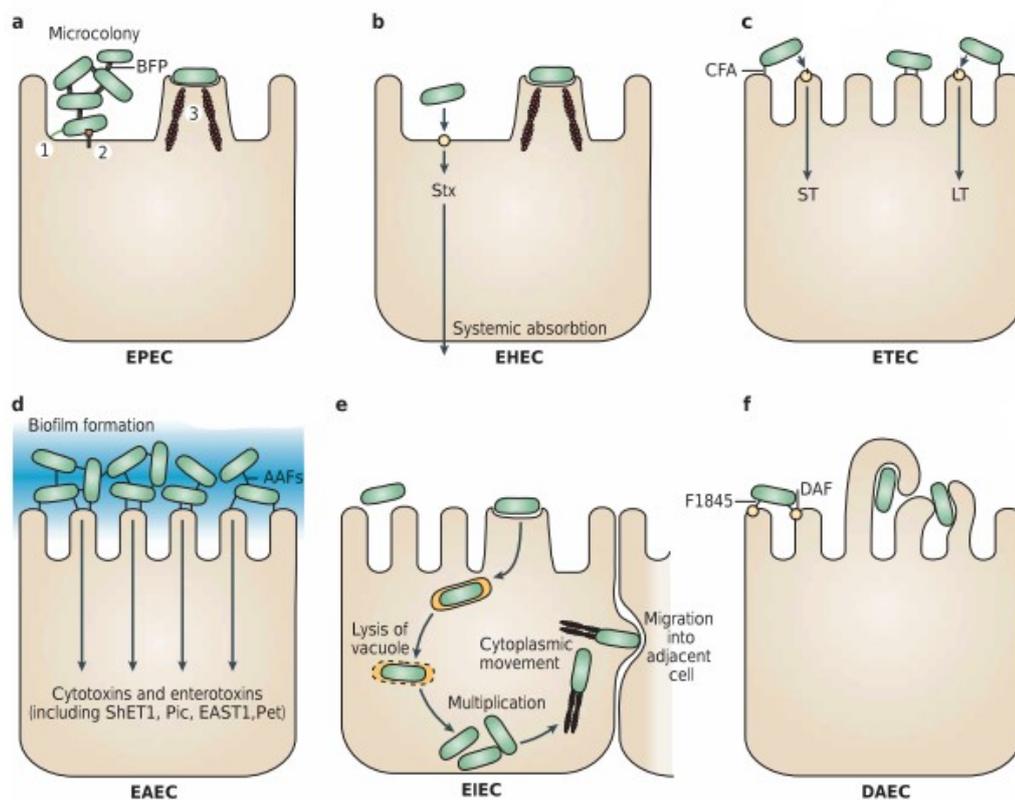


Figura 1.2. Representação esquemática dos mecanismos de interação entre os diferentes patótipos diarréio-gênicos de *E. coli* e as células do epitélio intestinal. **a.** *E. coli* enteropatogênica (EPEC) – indução da lesão denominada *attaching and effacing* (A/E). (1) Adesão ao enterócito, (2) Translocação proteica por sistema de secreção do tipo III, (3) alteração do citoesqueleto e destruição das microvilosidades. **b.** *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) – indução da lesão A/E adicionalmente à produção das toxinas Shiga (Stx), que são absorvidas e dão origem a complicações sistêmicas. **c.** *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) – Aderência a receptores específicos dos enterócitos, com produção de toxinas termoestáveis (ST) e/ou termolábeis (LT). **d.** *E. coli* enteroagregativa (EAEC) – adesão aos enterócitos e agregação dos microrganismos, com formação de um espesso biofilme e produção de toxinas como EAST1 e Pet. **e.** *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) – invasão dos enterócitos por lise do fagolisossoma e movimentação para células adjacentes com o auxílio de microfilamentos de actina. **f.** *E. coli* difusamente aderente (DAEC) – aderência a receptores dos enterócitos, como o DAF, e indução do crescimento de projeções celulares que envolvem as bactérias. Imagem adaptada de KAPER et al. (2004).

Além da caracterização dos isolados quanto ao potencial patogênico, a sorotipagem também é utilizada para o estudo da diversidade de *E. coli*. Todavia, a diversidade sorológica não necessariamente se correlaciona com a diversidade genética das estirpes. Com o avanço dos métodos moleculares, outras técnicas foram desenvolvidas para investigações epidemiológicas e

diferenciação das estirpes de *E. coli*, como o *multi-locus enzyme electrophoresis* (MLEE), que demonstrou a evolução clonal de *E. coli* e identificou a existência de grupos filogenéticos (OCHMAN, 1984; TENAILLON et al., 2010; WHITTAM; OCHMAN; SELANDER, 1983). Tais achados foram reforçados com o desenvolvimento e aplicação de outros métodos, como o *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), ribotipagem, *multilocus sequence typing* (MLST) e análise de genoma completo, que definiram a existência de sete grandes grupos filogenéticos (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012; CLERMONT; GORDON; DENAMUR, 2015; CROXEN et al., 2013).

Com o sequenciamento de 6 a 8 genes conservados em diferentes *loci* do cromossoma bacteriano, o MLST se tornou um dos métodos mais adequados para a discriminação e tipificação de estirpes de *E. coli*, sendo inferior apenas ao sequenciamento do genoma completo (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012). Todavia, desvantagens relacionadas ao maior custo para execução levou muitos pesquisadores a optarem por outros métodos. O desenvolvimento de uma PCR triplex, seguido de algumas modificações e evolução para quadruplex, possibilitou uma rápida e facilitada classificação das estirpes de *E. coli* em grupos filogenéticos a partir da análise de presença ou ausência de quatro genes, seguido ou não de reações adicionais (CLERMONT et al., 2000, 2013). Tais técnicas apresentam baixos índices de ausência de classificação em filogrupos ou atribuições errôneas, com correspondência de 80 a até 95% com a análise por MLST (CLERMONT et al., 2013; GORDON et al., 2008).

Os sete grandes grupos filogenéticos de *E. coli* foram designados A, B1, B2, C, D, E e F. Os primeiros filogrupos a surgirem foram o F e B2, sendo assim considerados mais basais, enquanto os demais grupos surgiram a partir destes (CLERMONT et al., 2011; TENAILLON et al., 2010). Os filogrupos A e B1 surgiram como “irmãos”, pela semelhança genética que existe entre eles (CLERMONT et al., 2000, 2013). Estirpes pertencentes a cada um dos grupos C e E são consideradas bastante similares, enquanto A, B1, D e B2 agrupam estirpes menos semelhantes entre si, o que é reforçado pela existência de nove subgrupos filogenéticos dentro do filogrupo B2 e dois em A (CLERMONT et al., 2011; TENAILLON et al., 2010) A figura 1.3 ilustra a distribuição e relação entre os grupos filogenéticos identificados em *E. coli* de referência comensais e patogênicas, isoladas de diferentes hospedeiros em diversas localizações geográficas.

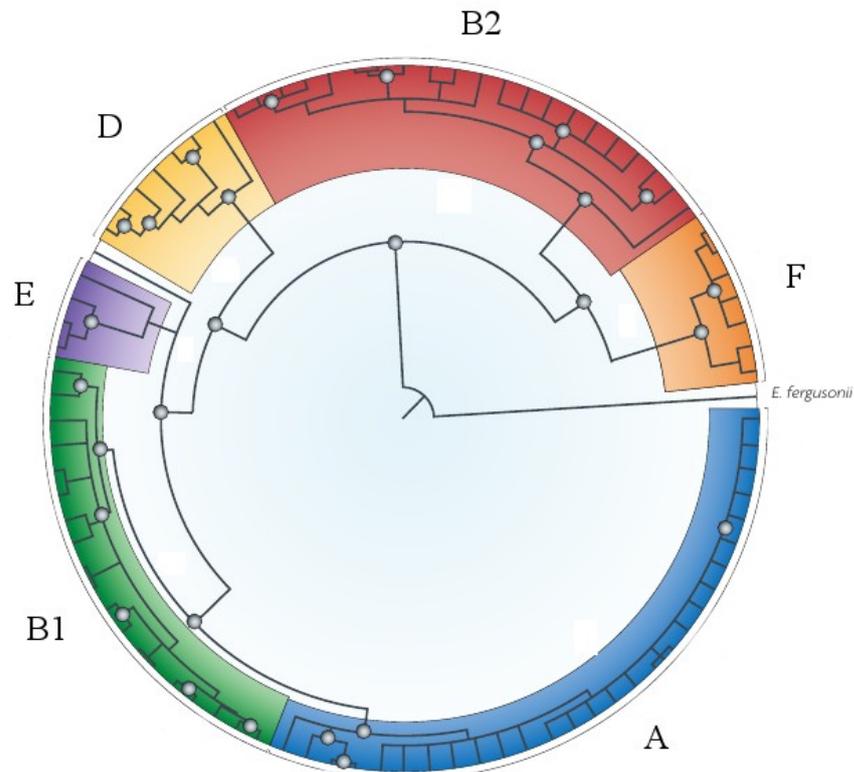


Figura 1.3. Relação entre os seis grupos filogenéticos identificados por MLST em estirpes da coleção de *E. coli* de referência (ECOR) e outras estirpes de referência em comparação com *E. fergusonii*. Imagem adaptada de TENAILLON et al. (2010).

Além da diferença genética observada entre os filogrupos, influenciada pela clonalidade e tamanho do genoma, as estirpes de diferentes grupos filogenéticos podem distinguir-se conforme características fenotípicas, como habilidade de fermentar diferentes açúcares, perfil de resistência a antimicrobianos e taxas de crescimento em diferentes temperaturas (GORDON, 2004). Sabe-se que *background* genético das estirpes de diferentes filogrupos de *E. coli* podem influenciar em sua capacidade de adquirir genes de resistência a antimicrobianos e, conseqüentemente, em sua frequência de isolamento e distribuição (GORDON, 2004; TENAILLON et al., 2010). Nesse contexto, estudos indicam que isolados do grupo B2 possuem menores índices de resistência se comparados aos demais filogrupos. Por outro lado, estirpes do filogrupo D seriam mais propensas ao desenvolvimento de resistência às cefalosporinas de terceira geração (TENAILLON et al., 2010).

A diferenciação das estirpes de *E. coli* em grupos filogenéticos e subgrupos pode possibilitar, conforme demonstrado por diversos estudos, a realização de inferências quanto a fonte de isolamento das amostras (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012; COURA et al., 2015). Alguns relatos demonstram que, em seres humanos, os filogrupos A (40,5%) são os mais frequentes, enquanto em animais as estirpes B1 são predominantes (41%) (DURIEZ et al., 2001; TENAILLON et al., 2010). Por sua vez, filogrupos B2 e D, mais especializados,

aparentam ser restritos a vertebrados endotérmicos (GORDON, 2004). Todavia, essa variação na distribuição dos grupos filogenéticos não deve ser atribuída a existência de estirpes específicas para diferentes hospedeiros, existindo outros fatores associados à frequência dos filogrupos. Características como ambiente, origem geográfica, dieta, morfologia do trato intestinal, massa corpórea e uso de antimicrobianos podem interferir em sua frequência e distribuição (GORDON et al., 2008; TENAILLON et al., 2010). Como exemplo, mamíferos onívoros e herbívoros tendem a portar estirpes de *E. coli* pertencentes ao filogrupo B2, enquanto carnívoros possuem maior população de B1 (GORDON; COWLING, 2003). Por sua vez, animais domesticados possuem uma menor proporção de isolados do filogrupo B2 e maior de A se comparado aos animais silvestres (TENAILLON et al., 2010). Adicionalmente, variações na diversidade genética de estirpes em um mesmo indivíduo também podem ocorrer, e os fatores que influenciam a diversidade são a qualidade do alimento ingerido e as condições climáticas onde habita o hospedeiro (GORDON, 2004; TENAILLON et al., 2010).

A partir da classificação das estirpes de *E. coli* em grupos filogenéticos, pode ser realizada, ainda, uma suposição de potencial patogênico do isolado. Alguns estudos relatam que patotipos de *E. coli* que provocam distúrbios extraintestinais são pertencentes principalmente ao filogrupo B2 e eventualmente D, considerados filogrupos mais especializados (CLERMONT et al., 2013; DURIEZ et al., 2001; ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004; JOHNSON et al., 2001). Já as estirpes pertencentes ao patotipo EHEC, principalmente o sorotipo O157:H7, geralmente enquadram-se ao filogrupo E (CLERMONT et al., 2011; ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004). Adicionalmente, estudos demonstram uma tendência dos filogrupos A, B1 e E a adquirirem fatores de patogenicidade relacionados a patotipos causadores de diarreia (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012; COURA et al., 2017; CLERMONT et al., 2011; ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004). Tais resultados sugerem que, como alguns patotipos parecem ser restritos a certos grupos filogenéticos, é necessário que exista um *background* genético para que haja aquisição, expressão e manutenção de determinados genes de patogenicidade (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012; ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004).

O carregamento de estirpes patogênicas de *E. coli* por animais diarreicos pode ser um forte indicativo para a causa da diarreia ou um importante fator predisponente para a sua ocorrência (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014). Além disso, os animais que eliminam *E. coli* patogênicas são importantes reservatórios do agente, que pode ser transmitido de forma direta ou indireta aos seres humanos (ZAMBRANO et al., 2014). Desta forma, o conhecimento e monitoramento de estirpes diarreio gênicas em animais é importante para prevenir a doença e minimizar as perdas relacionados à sua ocorrência, além de servir de alerta aos seres humanos, principalmente quando em estreito contato com os animais, reduzindo, assim, a sua exposição aos patógenos zoonóticos (CROXEN et al., 2013).

1.1 PATOTIPOS DE *Escherichia coli* CAUSADORES DE DIARREIA

1.1.1 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

E. coli Enterotoxigênica, denominada ETEC, é um importante agente causador de diarreia aguda e grave em bezerros, suínos e seres humanos, sendo um dos principais responsáveis pela ocorrência de diarreia em crianças de países em desenvolvimento e um importante agente etiológico da “diarreia dos viajantes” (NAGY; FEKETE, 2005). Em suínos e

bovinos neonatos, a colonização é favorecida pela presença de receptores para as adesinas de ETEC em células intestinais imaturas, adicionalmente ao menor pH estomacal, duodenal e menor produção de enzimas digestivas, que facilitam a sobrevivência do agente (BLANCHARD, 2012; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Além destes fatores, coinfeção com outros patógenos que provoquem a atrofia das vilosidades, como agentes virais ou *Cryptosporidium* spp., favorecem a ocorrência de colibacilose por ETEC em bezerros com idade superior a uma semana (BLANCHARD, 2012). A doença é também descrita em suínos na fase de creche (pós desmama), cuja ocorrência está associada a idade, alterações em sua dieta e coinfeções (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; NAGY; FEKETE, 2005). Alguns estudos sugerem a ocorrência de colibacilose por ETEC em cães diarreicos a partir da identificação do agente e suas enterotoxinas, cujo principal sorogrupo identificado é raramente encontrado em isolados de suínos, bovinos e seres humanos (Tabela 1.2) (BEUTIN, 1999; DROLET et al., 1994; HAMMERMUELLER et al., 1995; WASTESON et al., 1988). Em outros animais, como aves domésticas e equinos, as infecções por ETEC são bastante raras, apesar da existência de receptores para enterotoxinas nos enterócitos desses animais. Em ovinos, infecções por ETEC ocorrem com frequência, associadas aos mesmos fatores de patogenicidade e predisponentes relacionados aos quadros de colibacilose em bovinos (DUBREUIL; ISAACSON; SCHIFFERLI, 2016; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Tabela 1.2. Principais adesinas, enterotoxinas e sorogrupos de ETEC associadas a colibacilose em diferentes espécies hospedeiras

Adesinas	Toxinas	Sorotipos	Hospedeiro
F4 (K88), F18ac, F6 (987P), F5 (K99), F41	STaP, STb, LT-Ip, EAST-1	O149, O8, O141, O138	Suínos
F5 (K99), F41	STaP	O8, O9, O20, O101	Bovinos e ovinos
CFA-I, CS1 – CS6	LT-I, LT-II, STaP, STaH	O6, O8, O25, O72, O148, O153	Homens
Desconhecido	STaP	O42	Cães

A infecção dos hospedeiros ocorre com a ingestão de ETEC eliminada nas fezes de carreadores diarreicos ou assintomáticos. O agente coloniza a mucosa do intestino delgado após sua aderência a receptores espécie-específicos presentes nos enterócitos dos animais e seres humanos (BEUTIN, 1999; NAGY; FEKETE, 2005). A ligação de ETEC ao epitélio intestinal dos hospedeiros ocorre por adesinas fimbriais ou não-fimbriais, cuja frequência de ocorrência é variável conforme a espécie hospedeira (NAGY; FEKETE, 2005). Dessa forma, enquanto a adesina F4 (K88) liga-se especificamente a receptores em enterócitos de suínos, sendo, portanto, encontrada com maior frequência nessas espécies, F5 (K99) é isolada principalmente de ETEC de bovinos diarreicos. As principais adesinas identificadas em ETEC de animais e seres humanos estão descritas na tabela 1.2. Outros fatores de colonização, encontrados com menor frequência em ETEC de bovinos e suínos, são F17, CS31A e AIDA (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Em seres humanos, estudos demonstram a existência de mais de 23 fatores de colonização de ETEC, denominados CFA/I, CS1 a CS22, dos quais alguns destacam-se por serem mais comuns (GAASTRA; SVENNERHOLM, 1996; NAGY; FEKETE, 2005).

O nível de expressão dos receptores de adesinas pelos enterócitos é um dos principais fatores relacionados a idade que influenciam na susceptibilidade dos hospedeiros às infecções

por ETEC. Como relatado anteriormente, bovinos neonatos ou aqueles cujos enterócitos das vilosidades intestinais encontram-se imaturos expressam um maior número de receptores para as fimbrias F5 (K99). Da mesma forma, a expressão de receptores para as fimbrias F18, que raramente ocorre em suínos neonatos, aumenta significativamente em animais de até quatro semanas, período que geralmente coincide com a desmama, resultando em maior suscetibilidade à colibacilose por ETEC (BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010; GYLES; FAIRBROTHER, 2010; NAGY; FEKETE, 2005).

Apesar da especificidade quanto aos receptores dos enterócitos, a patogenia da doença e sinais clínicos apresentados pelos diversos hospedeiros acometidos por ETEC geralmente são similares (NAGY; FEKETE, 2005). Sem a indução de alterações morfológicas ao epitélio intestinal, ETEC produz, após ligar-se aos enterócitos, toxinas que são internalizadas pelas células epiteliais, resultando em aumento da permeabilidade intestinal e secreção de água e eletrólitos, o que dá origem à diarreia (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). As enterotoxinas produzidas por ETEC são diferenciadas principalmente conforme a sua resistência ao calor, existindo as toxinas termolábeis (LT) e as toxinas termoestáveis (ST) (DUBREUIL; ISAACSON; SCHIFFERLI, 2016). Estirpes enterotoxigênicas de *E. coli* produzem, a partir da codificação de genes plasmidiais, uma ou ambas as toxinas ST e LT, que são classificadas conforme o seu tamanho, estrutura molecular e atividade biológica (DUBREUIL; ISAACSON; SCHIFFERLI, 2016).

Correspondendo a uma molécula altamente imunogênica e homóloga à toxina CT produzida por *V. cholerae*, a toxina LT é dividida em dois subtipos antígenicamente diferentes, denominados LT-I e LT-II (DUBREUIL; ISAACSON; SCHIFFERLI, 2016). Adicionalmente, duas variantes de LT-I, que apresentam pequenas diferenças em sua composição e parcial reatividade cruzada, designados LTI-h e LT-Ip, são descritas na literatura. LT-Ih e LT-Ip são produzidas por ETEC isoladas de seres humanos, enquanto LT-Ip é frequentemente encontrada em isolados obtidos de suínos. LT-II, por sua vez, pode ser subdividida em duas variantes antigênicas, LT-IIa e LT-IIb, descritas em seres humanos e, com menor frequência, em bovinos, bubalinos e suínos (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; NAGY; FEKETE, 2005; NATARO; KAPER, 1998).

As toxinas termoestáveis são moléculas menores e de baixa imunogenicidade se comparadas às termolábeis. Classificadas em STa (STI) e STb (STII), essas toxinas diferenciam-se, principalmente, conforme a sua estrutura e mecanismos de ação. STa pode ser dividida, ainda, em duas variantes de diferentes tamanhos denominadas STaH e STaP, que são encontradas em diversas espécies hospedeiras (NATARO; KAPER, 1998). Enquanto STaH é comumente sintetizada por ETEC isoladas de seres humanos, STaP pode estar associada a quadros de diarreia em suínos, bovinos, ovinos e seres humanos, sendo ainda descrita em ETEC isolada de cães diarreicos. Por sua vez, STb é produzida principalmente por ETEC causadora de colibacilose em suínos, existindo alguns relatos em estirpes de cães, seres humanos e bovinos com diarreia (BEUTIN, 1999; GYLES; FAIRBROTHER, 2010; NAGY; FEKETE, 2005)

ETEC isoladas de suínos podem apresentar, ainda, a produção da toxina denominada EAST-1, originalmente descrita em estirpes de seres humanos pertencentes ao patotipo EAEC (DUBREUIL; ISAACSON; SCHIFFERLI, 2016). Possuindo características físicas e biológicas semelhantes a STa, a toxina EAST-1 pode também ser sintetizada por ETEC de seres humanos e bovinos, além de EHEC e determinados tipos de EPEC (NAGY; FEKETE, 2005). O seu papel

como única molécula indutora de diarreia em animais ainda é controverso, tendo em vista que EAST-1 é encontrado com grande frequência em isolados de animais diarreicos e saudáveis (VEILLEUX; DUBREUIL, 2006); todavia, relatos na literatura apontam que estirpes de *E. coli* que produzem apenas essa toxina são responsáveis pela ocorrência de diarreia em seres humanos (DUBREUIL; ISAACSON; SCHIFFERLI, 2016; ZHOU et al., 2002). As enterotoxinas comumente encontradas em isolados de ETEC de diferentes hospedeiros estão descritas na tabela 1.2.

Após a ligação das enterotoxinas aos respectivos receptores presentes na superfícies dos enterócitos, que são principalmente o GM1 (LT), guanilato ciclase (STa) e sulfatide (STb), ocorre a internalização das toxinas e o desencadeamento de uma cascata de sinalização intracelular. Tais eventos resultam em aumentada secreção de íons cloreto e bicarbonato, associado a menor absorção de íons sódio, que culmina com grande efluxo de água para o lúmen intestinal (DUBREUIL, 2017; DUBREUIL; ISAACSON; SCHIFFERLI, 2016). A enterotoxina STb induz, ainda, a formação de prostaglandina E2 e serotonina, que promovem o transporte de água e eletrólitos para fora das células intestinas por um mecanismo ainda desconhecido. Adicionalmente, as toxinas STa e STb podem provocar alterações na permeabilidade das junções de oclusão do epitélio intestinal, o que contribui com a patogênese do agente e potencializa a perda de água e eletrólitos pelo hospedeiro (DUBREUIL; ISAACSON; SCHIFFERLI, 2016). Desse modo, são originados quadros leves ou graves de diarreia aquosa, geralmente não sanguinolenta, que pode rapidamente resultar em desidratação, acidose metabólica e até morte do hospedeiro, dependendo da severidade (CROXEN et al., 2013; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

De forma geral, o aparecimento dos sintomas clínicos é rápido e a duração da diarreia nas espécies acometidas é de 3 a 5 dias (CROXEN et al., 2013). Em suínos neonatos, o quadro pode evoluir tão rapidamente de maneira a causar a morte do animal por choque endotóxico antes da ocorrência da diarreia. Achados *post mortem* de suínos, ovinos e bezerros infectados incluem dilatação dos intestinos delgado e grosso, com presença de líquido e gás no lúmen intestinal, e congestão dos vasos do intestino delgado (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Não são observadas alterações ao exame histopatológico do intestino delgado das espécies acometidas. Portanto, a pesquisa da ocorrência de diarreia por ETEC ocorre pela identificação do agente e seus fatores de patogenicidade, por meio de ensaios sorológicos ou de métodos que detectem os genes que codificam as adesinas e toxinas, como a PCR (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; CROXEN et al., 2013).

1.1.2 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Também reconhecido como AEEC (*attaching and effacing Escherichia coli*), EPEC foi o primeiro patotipo diarreio gênico de *E. coli* identificado. EPEC é responsável por induzir diarreia em seres humanos e em diversas espécies animais, como suínos, bovinos, coelhos e cães (BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Em seres humanos, as crianças são o grupo mais comumente acometido por EPEC, principalmente em países em desenvolvimento, sendo responsável por altas taxas de mortalidade em decorrência da diarreia. Os principais sorogrupos de EPEC isolados de seres humanos e outros hospedeiros estão descritos na tabela 1.3 (CROXEN et al., 2013). Bovinos jovens também correspondem ao grupo mais afetado por EPEC, sendo que a faixa etária mais susceptível ao agente são animais

de uma a 12 semanas de idade. Curiosamente, os sorogrupos mais comuns nessa espécie hospedeira são frequentemente isolados em amostras de seres humanos (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; CROXEN et al., 2013; DEBROY; MADDOX, 2001). A diarreia por EPEC em suínos geralmente ocorre no período pós desmama, sendo influenciada pela dieta e *status* imunológico do animal (DEBROY; MADDOX, 2001; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). EPEC é o patotipo de *E. coli* isolado com maior frequência de fezes de cães diarreicos e saudáveis. Alguns estudos demonstram seu papel como o agente etiológico da diarreia em filhotes e adultos, cuja ocorrência em diversos casos é acompanhada de achados histopatológicos compatíveis com a infecção (ALMEIDA et al., 2012; BEUTIN, 1999; DROLET et al., 1994; SANCAK et al., 2004). A maior parte dos sorogrupos isolados de cães são diferentes dos encontrados em seres humanos, apesar de existirem relatos que demonstram o isolamento em cães de sorogrupos de EPEC associados a infecção em seres humanos (ALMEIDA et al., 2012; BEUTIN, 1999; NAKAZATO et al., 2004). Além do potencial diarreio gênico apresentado por EPEC, alguns estudos demonstram que bovinos, ovinos, suínos e até seres humanos saudáveis podem carrear EPEC, tornando-se reservatórios do agente (CROXEN et al., 2013; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Tabela 1.3. Sorogrupos de *E. coli* Enteropatogênica (EPEC) comumente isolados de bovinos, suínos, cães e seres humanos.

Hospedeiro	Sorogrupo
Bovinos	O26, O111, O119 e O114
Suínos	O45
Cães	O45, O49, O115, O118 e O119
Homem	O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O127, O128, O142

Apesar de alguns estudos demonstrarem ausência de compatibilidade quanto aos sorogrupos encontrados em animais e seres humanos, sabe-se que os principais fatores de patogenicidade encontrados em EPEC, diferentemente de ETEC, são comuns aos diversos hospedeiros, sugerindo o potencial zoonótico desse patotipo (ALMEIDA et al., 2012; ARAIS et al., 2018; COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014). Adicionalmente, estudos demonstram a alta similaridade genética entre isolados de EPEC de diferentes espécies hospedeiras, incluindo entre isolados de cães e seres humanos, o que sugere a transmissão do agente entre espécies (ARAIS et al., 2018; CROXEN et al., 2013; RODRIGUES et al., 2004; SEKSE et al., 2011). O compartilhamento de fatores de patogenicidade entre os isolados de EPEC de diferentes hospedeiros e o tipo de lesão produzido pelo agente, que é comum a todas as espécies acometidas, sugere que a patogenia da doença e mecanismos de indução de diarreia sejam bastante semelhantes (GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Neste contexto, a principal característica de EPEC, comum aos isolados de diferentes espécies hospedeiras, é a lesão intestinal denominada *attaching and effacing* (A/E), cujo nome relaciona-se a íntima aderência do microrganismo ao epitélio intestinal (*attaching*) e a destruição das microvilosidades dos enterócitos, principalmente do intestino delgado (*effacing*) (FRANKEL et al., 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Os principais genes responsáveis pela lesão A/E estão inseridos na ilha de patogenicidade denominada LEE (*Locus*

of *Enterocyte Effacement*), presente nos patótipos EPEC e EHEC, que codificam importantes moléculas, como a adesina intimina (*eae*), o seu receptor TIR (*translocated intimin receptor*) e o sistema de secreção do tipo III (SST3) (CROXEN et al., 2013; DEBROY; MADDOX, 2001).

Para que a lesão A/E se desenvolva, é necessário que ocorra uma aderência inicial da bactéria à superfície da célula. Além da possível presença de adesinas como Iha (*IrgA Homologue Adhesin*), Efa1 (*EHEC factor for adherence*), ToxB e Lpf (*long polar fimbriae*), que promovem essa aderência inicial, existe ainda a fimbria BFP (*bundle-forming pilus*), codificada pelo plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor*) (BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010; COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014). De acordo com a presença ou não da fimbria BFP, estirpes EPEC podem ser classificadas como típicas (tEPEC) ou atípicas (aEPEC). Estirpes de tEPEC são aquelas que portam o plasmídeo EAF e produzem as fimbrias BFP, apresentando padrões de aderência localizada em ensaios celulares, sendo encontradas principalmente em isolados de seres humanos, podendo também ser isolado em amostras clínicas de cães (CROXEN et al., 2013; GOFFAUX et al., 2000; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Estirpes caracterizadas como EPEC atípicas (aEPEC) constituem um grupo de *E. coli* bastante heterogêneo, sendo consideradas mais semelhantes a estirpes do patótipo EHEC quanto a características sorológicas e genéticas. EPEC atípica possui grande importância em casos de surtos de diarreia em crianças, apesar de ser mais frequentemente descrita em isolados de animais, como bovinos, ovinos, suínos e cães (ALMEIDA et al., 2012; ARAIS et al., 2018; COURA et al., 2017; CROXEN et al., 2013; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

A ligação de BFP ou outras adesinas à superfície dos enterócitos desencadeia, subsequentemente, a ocorrência de uma série de eventos, como o estímulo a expressão dos genes de LEE e ativação do sistema de secreção do tipo III (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014). Com a formação SST3, ocorre translocação para a célula alvo de importantes proteínas efetoras, como o receptor TIR, que se insere na membrana citoplasmática da célula hospedeira e liga-se intimamente à adesina intimina recém-sintetizada. A fosforilação do receptor TIR após a sua adesão a intimina induz uma cascata de eventos, que resultam na destruição das microvilosidades, no rearranjo de proteínas do citoesqueleto e no acúmulo localizado de actina polimerizada. Essas alterações na arquitetura celular dão origem a uma estrutura em formato de pedestal na superfície da célula, sobre a qual a bactéria estará aderida (CROXEN et al., 2013; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Tais eventos resultam em menor capacidade absorptiva pela destruição das microvilosidades, bem como eventual atrofia das vilosidades por morte celular, o que dá origem a diarreia. Todavia, a ocorrência de diarreia por EPEC é estimulada também por outros fatores. Proteínas efetoras translocadas pelo SST3, como EspF, EspG, Map e NleA podem ser responsáveis por alterações que induzem a ocorrência de diarreia por mecanismos secretórios, com a formação de poros na membrana celular, diminuição da integridade das junções de oclusão e alterações nos canais de íons (CROXEN et al., 2013; GYLES; FAIRBROTHER, 2010; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Dessa forma, devido à gravidade da lesão presente na mucosa, os hospedeiros infectados podem apresentar sintomatologia prolongada da doença entérica (CROXEN et al., 2013; DEBROY; MADDOX, 2001). A consistência e cor das fezes podem variar, podendo apresentar-se mais aquosas ou pastosas, amareladas ou sanguinolentas (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014).

Ao exame histopatológico de colibacilose induzida por EPEC, podem ser observadas lesões A/E principalmente no intestino delgado dos hospedeiros. Adicionalmente, podem ser visualizadas descamações dos enterócitos e atrofia das vilosidades. Em microscopia eletrônica, pode-se observar a íntima adesão bacteriana ao epitélio das células intestinais, com destruição das microvilosidades e formação de pedestais na superfície da célula (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Todavia, testes moleculares que permitam a identificação de sequências que codificam importantes fatores de patogenicidade de EPEC, como PCRs para a amplificação dos genes *eae* e *bfp*, são métodos mais utilizados para a caracterização do agente, devido a facilidades na execução e acurácia dos resultados (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; CROXEN et al., 2013).

1.1.3 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) e *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC)

E. coli enterohemorrágica (EHEC) é um patotipo que, além de carrear a ilha de patogenicidade LEE, responsável pela formação da lesão A/E, produz toxinas denominadas Shiga, que possuem efeito citotóxico em células Vero. Essas toxinas são também sintetizadas pelo patotipo *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), reconhecido ainda como *E. coli* verotoxigênica (VTEC), cujo potencial diarreio gênico está atribuído a atividade patogênica dessas toxinas, sem a presença de lesões A/E (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

EHEC e STEC são patotipos de grande relevância para a saúde pública, estando associados a surtos de infecções alimentares em seres humanos, dando origem a diarreia, colite hemorrágica e a síndrome hemolítica urêmica (HUS). Os principais sorogrupos e sorotipos de EHEC e STEC relacionados a infecções em seres humanos são o O157:H7, O26, O45, O103, O111, O113, O121 e O145, dos quais grande parte é encontrada em isolados de animais. Dessa forma, uma das principais vias de transmissão do agente para os seres humanos é o contato com os animais ou suas fezes, principalmente ruminantes (CROXEN et al., 2013; DEBROY; MADDOX, 2001; NGUYEN; SPERANDIO, 2012). STEC e EHEC podem também ser responsáveis por quadros de diarreia e disenteria em bovinos e ovinos jovens, apesar de essa espécie hospedeira poder carrear o agente de forma persistente sem apresentar sintomas clínicos. Os bovinos são importantes reservatórios de EHEC e STEC, sendo que a principal fonte de infecção para os seres humanos são produtos de origem animal contaminados pelos agentes eliminados nas fezes dos bovinos. De fato, os principais sorogrupos e sorotipos de STEC e EHEC isolados das fezes de bovinos são O157:H7, O5, O8, O26, O103, O111 e O118 (DEBROY; MADDOX, 2001; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Em suínos, STEC e EHEC estão relacionados principalmente a ocorrência da doença do edema (DE) em suínos recém desmamados, doença sistêmica responsável por sérios prejuízos produtivos e mortalidade de animais. Os sorogrupos associados a doença do edema são, geralmente, O139, O138 e 141, podendo ser encontrado o sorogrupo O121, comum em infecções nos seres humanos (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; KUSUMOTO et al., 2016). Em cães, STEC e EHEC podem estar presentes nas fezes de animais diarreicos e saudáveis, mas sem que haja uma clara associação entre o isolamento desses patotipos e a ocorrência de diarreia sanguinolenta e a síndrome hemolítica urêmica (BEUTIN, 1999; GYLES; FAIRBROTHER, 2010; HAMMERMUELLER et al., 1995; SANCAK et al., 2004). Todavia, estudos demonstraram o carreamento do sorotipo

O157:H7 e outros sorogrupos por cães saudáveis, sugerindo o potencial reservatório do agente (BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010; BEUTIN, 1999; HOGG et al., 2009).

A colonização de EHEC e STEC ocorre no intestino delgado e principalmente intestino grosso dos hospedeiros, após aderência que pode ocorrer por diferentes adesinas não específicas a espécie hospedeira, como Efa1, Iha, ToxB, Lpf e Saa (STEC *autoagglutinating adhesin*), esta última encontrada apenas em isolados de STEC (BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010; COURA et al., 2017; CROXEN et al., 2013). Após a colonização, os microrganismos sofrem estímulos para produção de toxinas Shiga, acompanhado ou não da expressão dos genes inseridos na ilha de patogenicidade LEE, que está associado a maior severidade da doença. A produção das toxinas Shiga a partir de genes presentes em bacteriófagos é o principal fator de patogenicidade de STEC, estando diretamente associado ao desenvolvimento da síndrome hemolítica urêmica nos seres humanos e à doença do edema em suínos (BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010; FARFAN; TORRES, 2012; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Adicionalmente, pode ocorrer a produção da toxina enterohemolisina (EhxA), cuja atividade parece estar envolvida com a citotoxicidade frente as células endoteliais e a disponibilidade de ferro para as células bacterianas, contribuindo com a sobrevivência dos microrganismos e com a ocorrência da doença (CROXEN et al., 2013; GYLES; FAIRBROTHER, 2010; MAINIL, 2013).

As toxinas Shiga de EHEC e STEC, assim denominadas em razão de sua semelhança estrutural e antigênica com a toxina Shiga produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, podem ser classificadas em dois tipos e diversos subtipos de diferentes atividades biológicas e imunorreatividades, que são Stx1 (a, c e d) e Stx2 (a até g) (CASANOVA et al., 2018; CROXEN et al., 2013; NGUYEN; SPERANDIO, 2012). Os isolados de STEC e EHEC podem produzir uma ou ambas toxinas e suas combinações, cujos tipos influenciam na ocorrência de doenças e severidade dos sinais clínicos (CROXEN et al., 2013; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Em seres humanos, todos os tipos de toxinas Shiga podem provocar o desenvolvimento da síndrome hemolítica urêmica; todavia, são consideradas mais patogênicas as estirpes que produzem Stx2, que induzem o desenvolvimento de quadros mais severos (CROXEN et al., 2013). Em suínos, Stx2e é o principal responsável pelo desenvolvimento da doença do edema, sendo encontrado quase que exclusivamente em isolados dessa espécie animal (CASANOVA et al., 2018; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Tais variações se devem à presença de receptores de Stx na superfície do endotélio vascular de seres humanos e suínos, bem como nos enterócitos de suínos, denominados Gb3 e Gb4 (específico para Stx2e), cuja existência e especificidade de ligação à toxina determina a fisiopatologia da doença nos diversos hospedeiros (CASANOVA et al., 2018; COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; MAINIL, 2013; NGUYEN; SPERANDIO, 2012).

O mecanismo pelo qual as toxinas Shiga são transportadas do lúmen intestinal até o endotélio vascular é, até então, desconhecido. Contudo, sabe-se que, após ligar-se aos receptores endoteliais, as toxinas são internalizadas e liberadas para o citosol da célula, onde são desencadeados eventos que culminam com a morte celular e danos vasculares (CASANOVA et al., 2018; CROXEN et al., 2013; GYLES; FAIRBROTHER, 2010; NGUYEN; SPERANDIO, 2012). Dessa forma, as toxinas circulantes na corrente sanguínea podem ligar-se aos receptores presentes em células endoteliais de diversos tecidos, cuja expressão e consequente lesão tecidual é variável conforme a espécie hospedeira (MAINIL, 2013; NGUYEN; SPERANDIO, 2012). Como o endotélio dos capilares glomerulares de seres humanos expressam altos níveis de receptores Gb3, infecções causadas por STEC/EHEC nessa espécie dão origem a alterações

renais severas (NGUYEN; SPERANDIO, 2012). Por outro lado, os suínos expressam Gb3 e Gb4 em células endoteliais de diversos órgãos, incluindo tecido nervoso, o que resulta em alteração vascular sistêmica com hemorragias e extravasamento de líquido para o estroma, dando origem ao edema (CASANOVA et al., DEBROY; MADDOX, 2001; MAINIL, 2013).

Embora os enterócitos de bovino expressem receptores Gb3, essa espécie não possui receptores para Stx na superfície do endotélio, motivo pelo qual não desenvolvem manifestações clínicas sistêmicas. Todavia, Stx é capaz de induzir apoptose das células intestinais do cólon, cujo dano pode resultar em necrose e colite hemorrágica nesse e outros hospedeiros (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Dessa forma, os sinais clínicos que podem ser apresentados pelos hospedeiros infectados são, além da possível formação da lesão A/E intestinal e alterações clínicas envolvidas, ocorrência de diarreia mucoide a sanguinolenta (CROXEN et al., 2013; DEBROY; MADDOX, 2001). Pessoas infectadas apresentam o risco de desenvolver a síndrome hemolítica urêmica, geralmente após o início da diarreia, caracterizada pela ocorrência de trombocitopenia, anemia hemolítica e alteração renal aguda (CROXEN et al., 2013). Os suínos infectados geralmente não apresentam alterações relacionadas ao trato intestinal, estando as lesões associadas principalmente ao endotélio vascular, apesar da presença de receptores Gb3 e Gb4 em seu epitélio intestinal. Sinais como edema na região da cabeça, alterações neurológicas e problemas respiratórios podem ser observados nessas espécies (CASANOVA et al., 2018; DEBROY; MADDOX, 2001; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Na necropsia de hospedeiros com diarreia podem ser observadas lesões características de enterite, principalmente no intestino grosso, podendo se estender para o intestino delgado. Podem ser observadas lesões tipo A/E, associado a edema e infiltrado neutrofílico na lâmina própria (DEBROY; MADDOX, 2001; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Os métodos mais utilizados para a pesquisa de EHEC e STEC são testes moleculares para identificação dos principais genes de patogenicidade associados aos agentes, bem como ensaios celulares ou imunológicos, para observação dos efeitos citotóxicos e identificação das toxinas Shiga, respectivamente (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; CROXEN et al., 2013).

1.1.4 *Escherichia coli* necrotoxigênica (NTEC)

Originalmente definidas como estirpes produtoras das toxinas denominadas *cytotoxic necrotizing factor* (CNF), *E. coli* necrotoxigênica (NTEC) foi identificada pela primeira vez em isolados de fezes de crianças diarreicas. Sabe-se da existência de dois principais tipos de toxinas produzidas por NTEC, identificadas como CNF-1 e CNF-2, que possuem semelhanças antigênica e genética, diferenciando o patótipo em NTEC-1 e NTEC-2 (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999; KNUST; SCHMIDT, 2010). Adicionalmente, foi descrito uma terceira toxina produzida por NTEC, denominada CNF-3, primeiramente identificada em isolados de fezes de um ovino saudável (ORDEN et al., 2007).

Além do potencial de causar diarreia em seres humanos, especialmente crianças, NTEC-1 é também descrita como um patógeno responsável por infecções extraintestinais, principalmente relacionados ao trato geniturinário e sistema nervoso, motivo pelo qual são também denominadas *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* associada a meningite (MNEC) (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Em suínos

neonatos, NTEC-1 é frequentemente isolada de animais saudáveis e diarreicos, existindo relatos que demonstram a sua associação a quadros de diarreia e septicemia. A maior parte dos isolados de NTEC-1 de suínos são de sorogrupos também comuns em seres humanos, que correspondem a O2, O4, O8, O54, O78 e O83 (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999). Em ruminantes domésticos, como bovinos, ovinos e caprinos, NTEC-2 é o patotipo necrotoxigênico mais comumente encontrado, cuja frequência de isolamento é maior em animais mais novos. Apesar de poder ser isolado de animais saudáveis, alguns estudos demonstram a sua associação a quadros de diarreia e septicemia, especialmente em bovinos, adicionalmente a quadros de infecções extraintestinais (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; DEBROY; MADDOX, 2001). Apesar da menor ocorrência, alguns estudos também relataram a associação de NTEC-1 a quadros de diarreia e septicemia em bezerros (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999). NTEC-3 foi associada a quadros de enterite apenas em cordeiros, além de poder ser encontrada em fezes de ovinos e caprinos saudáveis (ORDEN et al., 2007). Alguns estudos apontam NTEC-1 como agente etiológico de quadros diarreia e infecções extraintestinais em cães, especialmente relacionados ao trato urinário, similarmente ao que ocorre em seres humanos (STARČIČ et al., 2002). Adicionalmente, cães saudáveis podem ser carreadores do agente, o que os torna potenciais reservatórios de NTEC-1 para os seres humanos (JOHNSON; STELL; DELAVARI, 2001). Nesse aspecto, os sorogrupos de NTEC-1 de cães são comuns aos isolados de seres humanos e suínos, correspondendo a O2, O4, O6 e O23 (BEUTIN, 1999; DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999).

Adicionalmente ao compartilhamento de sorogrupos, é demonstrado que estirpes de NTEC-1 isoladas de animais e seres humanos possuem diversos fatores de patogenicidade em comum e podem ser geneticamente relacionadas (JOHNSON; CLABOTS, 2006; JOHNSON; STELL; DELAVARI, 2001), o que sugere o papel dos animais como reservatórios desses agentes que causam diarreia e doenças severas em seres humanos (STARČIČ et al., 2002). Tal fato é agravado pelo possível carreamento do agente no trato intestinal de animais saudáveis, como suínos e principalmente cães, que podem estar em estreito contato com os seus tutores (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Ensaios demonstram que, além do compartilhamento de fatores de patogenicidade e sorogrupos entre estirpes de NTEC-1 de diversos hospedeiros, o comportamento dos diferentes isolados frente a ensaios celulares são bastante semelhantes, o que sugere semelhante patogenia do agente (JOHNSON et al., 2000).

Após a ligação de NTEC ao epitélio intestinal por diversas adesinas, ocorre a síntese e a ligação aos receptores e endocitose das citotoxinas CNF, principal característica de NTEC. Tais toxinas possuem a capacidade de induzir a reorganização do citoesqueleto a partir da ativação de proteínas Rho GTPases, presentes no citosol celular, responsáveis pela regulação da fisiologia do esqueleto celular, pela proliferação e apoptose das células (KNUST; SCHMIDT, 2010). As células assumem formato achatado e ocorre a formação de estruturas semelhantes a dedos (*filopodia*) externamente às células, a partir da síntese de filamentos de actina denominados fibras de estresse. Adicionalmente, as toxinas CNF conferem às células capacidade de ingerir quaisquer partículas em contato com a membrana celular, incluindo as bactérias, que parece estar associado a estratégias de multiplicação e transcitose para a corrente sanguínea e outros tecidos (DEBROY; MADDOX, 2001). Ademais, ocorre o maior estímulo à síntese de DNA, que associado a inibição da divisão celular pela modificação do citoesqueleto, resulta na formação de células gigantes multinucleadas (DE RYCKE; MILON; OSWALD,

1999; KNUST; SCHMIDT, 2010). Essas citotoxinas são letais quando injetadas no peritônio camundongos, além de também serem capazes de induzir necrose na pele de coelhos, o que deu origem ao seu nome (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999).

Considerada mais potente que CNF-2, a citotoxina CNF-1 é codificada por um gene cromossomal localizado em uma ilha de patogenicidade (PAI). CNF-1 geralmente está associada a outros genes de patogenicidade encontradas na mesma PAI, como alfa-hemolisina (*hly*) e fimbrias tipo P (*pap/prs*) que, dentre outras adesinas, podem estar presentes em NTEC-1, como as fimbrias S (*sfa*) e H (*fimH*), importantes para a adesão bacteriana (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; STARČIĆ et al., 2002). Além das alterações associadas as toxinas CNF, estudos *in vitro* demonstraram que CNF-1 pode promover a destruição das microvilosidades, bem como alterar a permeabilidade das junções de oclusão, mecanismos que podem estar associados a ocorrência da diarreia nos hospedeiros (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999). A citotoxina CNF-2 é codificada por um gene localizado em um plasmídeo, cujo nome é *Vir*, que pode conter também genes que codificam outros importantes fatores de patogenicidade de NTEC-2, como a fímbria F17, a adesina AfaE-VIII e a toxina distensora citolateral tipo 3 (CDTIII) (BOUGUÉNEC et al., 2001; DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999; JOHNSON et al., 2010; VAN BOST et al., 2001).

Conforme relatado, NTEC pode ser responsável por uma série de alterações clínicas, que induzem o desenvolvimento de sinais entéricos e/ou sistêmicos. Enquanto crianças infectadas por NTEC-1 podem desenvolver enterite, doenças extraintestinais causadas pelo mesmo agente que podem ser comuns em seres humanos são a meningite, cistite e a septicemia (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999; MICENKOVÁ et al., 2016). Da mesma maneira, cães de diferentes idades podem sofrer quadros de cistite e piometra, além de gastroenterite provocados por NTEC-1 (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; STARČIĆ et al., 2002). Em suínos neonatos que desenvolveram infecção intestinal por NTEC-1, podem ocorrer casos de enterite necrótica, enterocolite e translocação bacteriana com ocorrência de pneumonia intersticial e septicemia (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999). Apesar de não ser comum, bezerros que se infectam por NTEC-1 podem desenvolver enterite e/ou colite hemorrágica, acompanhadas ou não de septicemia. Todavia, os bovinos geralmente infectam-se por NTEC-2, que é responsável pela ocorrência de enterocolite, que pode ser acompanhada de bacteremia e infecção pulmonar em bezerros. Bovinos mais velhos podem ainda sofrer infecções por NTEC-2 na glândula mamária e útero, que resultam no desenvolvimento de mastite e metrite (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Considerando a existência de diferentes fatores de patogenicidade que caracterizam NTEC-1 e NTEC-2, os patotipos podem ser identificados através da pesquisa dos genes codificadores das toxinas CNF-1 e CNF-2 por métodos moleculares, acompanhados ou não de testes adicionais para a pesquisa de outros fatores, ou através de ensaios de citotoxicidade em cultura de células (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; DEBROY; MADDOX, 2001)

1.1.5 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

E. coli enteroagregativa (EAEC ou EA_gEC) é reconhecida como um agente potencialmente causador de diarreia em crianças e adultos imunocomprometidos, de países desenvolvidos ou em desenvolvimento. EAEC é também considerada agente etiológico da “diarreia do viajante”, estando associada a alimentos e bebidas contaminadas. A maior parte dos relatos de diarreia por EAEC o associam a ocorrência endêmica em diversas regiões, apesar de existirem relatos que descrevem a ocorrência em surtos (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Adicionalmente a associação do patotipo a ocorrência de diarreia em pessoas de diversas idades, alguns estudos demonstram que o isolamento de EAEC em espécimes de bebês está associado ao retardo no seu desenvolvimento, provavelmente em razão de uma inflamação persistente do intestino e conseqüente menor absorção de nutrientes (CROXEN et al., 2013; NATARO; KAPER, 1998). Existem poucos relatos quanto a presença de EAEC em amostras de animais diarreicos, cuja ocorrência já foi demonstrada em bovinos, suínos, equinos e em cães (PUÑO-SARMIENTO et al., 2013; UBER et al., 2006).

Estirpes de EAEC são reconhecidas por aderirem a células HEp-2 em um padrão reconhecido como “aderência agregativa” (AA), fenótipo codificado por genes inseridos no plasmídeo pAA, caracterizado por uma proeminente aglutinação entre as bactérias que ocorre na superfície apical das células, dando um aspecto de “tijolos empilhados” (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; NATARO; KAPER, 1998). Até o momento, não foi descrito nenhum fator de patogenicidade que esteja presente em todas as estirpes diarreio gênicas com o padrão fenotípico de EAEC, patotipo cuja principal característica reúne estirpes virulentas e avirulentas (CROXEN et al., 2013; UBER et al., 2006). Ademais, existe uma grande heterogeneidade também quanto aos sorotipos dos isolados, dificultando a caracterização dos grupos quando ao potencial patogênico (VIJAY et al., 2015).

Apesar da ausência de marcadores que identifiquem todas as estirpes patogênicas de EAEC, a maior parte dos isolados causadores de diarreia em seres humanos têm inserido ao plasmídeo pAA genes de patogenicidade responsáveis pela codificação de importantes fatores de patogenicidade, incluindo as fimbrias AAF/I-III, a toxina EAST-1 (*astA*), e principalmente o fator regulador transcricional AggR (*aggr*) (UBER et al., 2006). Foi demonstrado que o gene regulador *aggr* exerce papel central na patogênese de EAEC, sendo requerido para a expressão de diversos genes de patogenicidade plasmidiais e cromossômicos, cuja presença pode indicar virulência do patotipo (SARANTUYA et al., 2004). De fato, estudos associam a ocorrência de diarreia em seres humanos à presença do gene *aggr*, cuja identificação classifica as estirpes EAEC como típicas, e a ausência de *aggr* como atípicas (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; SARANTUYA et al., 2004). Curiosamente, os isolados de EAEC em suínos, equinos e bovinos diarreicos dos estudos citados anteriormente foram caracterizados como atípicos, o que pode indicar que estes animais possivelmente não são reservatórios da principal subpopulação causadora de diarreia em seres humanos (COURA et al., 2017; UBER et al., 2006), contrário ao demonstrado em um estudo realizado em cães, cujos isolados de EAEC são típicos (PUÑO-SARMIENTO et al., 2013). Todavia, existem relatos que demonstram a emergência e associação de EAEC atípica a surtos de diarreia em seres humanos, apesar de pouco se saber sobre os fatores de patogenicidade associados a essas estirpes atípicas causadoras de diarreia nesses hospedeiros e em animais (SARANTUYA et al., 2004; VIJAY et al., 2015).

Mesmo com a grande heterogeneidade e variações quanto a presença de fatores de patogenicidade em isolados patogênicos de EAEC, sabe-se que, igualmente a outros patotipos de *E. coli*, estes patotipos aderem-se e colonizam a mucosa intestinal, seguido da síntese de enterotoxinas e citotoxinas e da ocorrência de inflamação (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). As estirpes patogênicas de EAEC ligam-se ao epitélio do intestino delgado e/ou intestino grosso, cujo padrão de adesão e características bacterianas forma um biofilme espesso na mucosa intestinal, que pode resultar em colonização persistente do agente (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; VIJAY et al., 2015). Dentre as adesinas mais conhecidas, destacam-se as afimbriais AAF-I, AAFII, AAFIII, AAF-IV, as fimbrias tipo IV e as adesinas Hda. Após a adesão, EAEC patogênica pode produzir diversos tipos de toxinas e proteínas efetoras, cujos efeitos podem estar relacionados a hipersecreção, perda das microvilosidades e até destruição das vilosidades (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; NATARO; KAPER, 1998). São conhecidas as toxinas Pet, responsáveis por alterações no citoesqueleto, ShET1, que aparentemente induz aumento de secreção celular, e a mucinase Pic, que facilita a ligação bacteriana à mucosa (CROXEN et al., 2013; HENDERSON et al., 1999). Pode ocorrer ainda a produção da enterotoxina termoestável EAST-1, que possui atividade bastante similar às toxinas STa, a partir do gene *astA* plasmidial ou cromossomal (VEILLEUX; DUBREUIL, 2006). É possível que estirpes de *E. coli* possuam fatores de patogenicidade característicos de diversos patotipos, devido à grande facilidade de aquisição e perda de genes de virulência, em sua maioria móveis, o que as caracteriza como recombinantes (TENAILLON et al., 2010). Nesse contexto, foi relatado no ano de 2011 um grande surto causado por estirpes recombinantes de EAEC e STEC, que afetou mais de quatro mil pessoas em 16 países europeus. O sorotipo responsável pelo surto foi o O104:H4, um patógeno de *E. coli* considerado recombinante por possuir genes de patogenicidade de EAEC (incluindo *aggr*, *set1* e *pic*) e de STEC (*stx2*) (CROXEN et al., 2013).

Estudos demonstram que estirpes patogênicas de EAEC podem induzir danos leves a até severos à mucosa intestinal, adicionalmente a formação de uma camada espessa de muco sobre o epitélio (HENDERSON et al., 1999). Os sinais clínicos variam de diarreia mucoide a aquosa, ocasionalmente com presença de sangue. Os hospedeiros infectados podem apresentar febre, episódios de vômito e dores abdominais (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006) (CROXEN et al., 2013). Para o diagnóstico, a realização de ensaios celulares para visualização do padrão de aderência de EAEC é considerado o método “padrão ouro” para a identificação do agente, apesar de essa técnica não permitir a sua diferenciação entre patogênico e não patogênico (CROXEN et al., 2013). Dessa maneira, mesmo na ausência de marcadores que sejam comuns a todos os isolados patogênicos de EAEC, são realizados ensaios moleculares para a detecção de importantes genes de patogenicidade que estão comumente envolvidos na patogenia de EAEC, dos quais o fator Aggr possui destaque (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

1.1.6 *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

E. coli enteroinvasiva (EIEC) é um patógeno intracelular facultativo bastante similar às bactérias do gênero *Shigella* quanto as suas características bioquímicas, genéticas e patogênicas, sendo descritas como indistinguíveis taxonomicamente (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998). De fato, dados de estudos filogenéticos demonstraram que *Shigella*

spp. possivelmente é pertencente à espécie *E. coli*, formando um único patotipo junto a EIEC, apesar de ambos estarem distribuídos em diferentes grupos na árvore filogenética (CROXEN et al., 2013; LAN et al., 2004). Todavia, considerando a significância clínica da shigelose, que foi descrita antes da descoberta de EIEC, ainda é mantida a distinção de nomenclatura dos agentes (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Estirpes de *Shigella* spp. e EIEC podem compartilhar, ainda, diversos sorogrupos em comum, como O112, O124 e O152, o que torna passível de erros a diferenciação dos agentes durante a realização de testes bioquímicos, sorológicos e até genéticos (CROXEN et al., 2013; LAN et al., 2004).

Descrito como um enteropatógeno que acomete os seres humanos e outros primatas, o patotipo enteroinvasivo de *E. coli* geralmente é relatado em situações de surtos associados a ingestão de água ou alimentos contaminados (MAINIL, 2013; NATARO; KAPER, 1998). Todavia, a ocorrência de surtos causados por EIEC é rara, o que pode ser consequência de subnotificação da doença devido a sintomatologia clínica pouco severa, adicionalmente a possíveis falhas na identificação do agente. Por outro lado, existem muitos relatos de shigelose humana, considerada endêmica principalmente em crianças de países em desenvolvimento, cuja ocorrência está associada a até 50% dos casos de disenteria bacilar mundialmente. A infecção causada por *Shigella* spp. é um grande problema de saúde pública, estando associada a altas taxas de mortalidade e sendo considerada uma das quatro principais causas de diarreia moderada ou severa em crianças (CROXEN et al., 2013). Além do isolamento em primatas não humanos, um estudo relatou a possível detecção de EIEC na mucosa intestinal de cães da raça bulldog que apresentavam lesões características de colite granulomatosa, cuja ocorrência foi atribuída à presença do agente e susceptibilidade genética da raça (MANCHESTER et al., 2013).

Conforme mencionado, EIEC e *Shigella* spp. compartilham de mecanismos de patogenicidade semelhantes, que os tornaram capazes de infectar e sobreviver no meio intracelular. A aquisição do plasmídeo de invasão pINV é um dos principais fatores relacionados a patogênese destes agentes, que associado a aquisição de alguns elementos genéticos móveis e silenciamento de outros desnecessários para o ambiente intracelular, contribuem para a virulência dos agentes (CROXEN et al., 2013; LAN et al., 2004).

Através da codificação de genes presentes no cromossomo ou no plasmídeo pINV, ocorre a produção de fatores como o sistema de secreção do tipo III, chaperonas e outras proteínas efetoras, que tornam os patógenos capazes de invadir as células epiteliais do intestino grosso, se movimentarem pelo citoplasma e para células adjacentes, infectando-as (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Após a adesão bacteriana às células M, através de fatores como IpaB, ocorre a penetração do agente nessas células e posterior lise dos vacúolos endocíticos, com liberação do patógeno para o citoplasma e consequente multiplicação bacteriana (CROXEN et al., 2013). Alterações no citoesqueleto como a condensação da actina nas extremidades da célula, que culmina com a formação de protuberâncias celulares englobadas por células vizinhas, adicionalmente a desestabilização dos microtúbulos, permitem que as estirpes de EIEC e *Shigella* spp. se movam pelo citoplasma e para as células epiteliais adjacentes. Tal fato é possibilitado pela ação de fatores como VirA, VirG e outras proteínas efetoras do SST3 (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Além de colonizarem o meio intracelular do epitélio intestinal, os patógenos podem produzir e secretar enterotoxinas, que atuam no desenvolvimento da diarreia em conjunto com a resposta inflamatória desencadeada com a infecção (NATARO; KAPER,

1998). Enterotoxinas como a ShET2, que possui atividade secretória e resulta em diarreia aquosa, são comuns a diferentes sorotipos de *Shigella* spp. e EIEC (CROXEN et al., 2013).

EIEC e *Shigella* spp. presentes na submucosa podem ser fagocitados por macrófagos residentes. Todavia, esses microrganismos podem secretar proteínas efetoras, como a IpaH e IpaB, que os tornam capazes de escapar do fagossomo, seguido da indução de apoptose dos macrófagos (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Entretanto, diferentemente de outras enterobactérias invasoras, como a *Salmonella* spp., esses agentes não atingem a corrente sanguínea e linfática disseminando-se para outros órgãos, mas infectam apenas o epitélio intestinal (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Apesar de EIEC e *Shigella* spp. apresentarem as mesmas estratégias para invasão e sobrevivência intracelular, sabe-se que estirpes de *Shigella* spp. são mais patogênicas quando comparadas a EIEC, que possui menor potencial indutor da destruição dos macrófagos, reduzida capacidade de mobilização entre células e menor indução da resposta pró-inflamatória do hospedeiro, o que condiz com a sintomatologia clínica menos severa da doença provocada por EIEC (CROXEN et al., 2013). Dessa maneira, a gravidade dos sinais clínicos e progressão da doença apresentada pelo hospedeiro variam, dentre outros fatores, conforme o agente bacteriano envolvido. De forma geral, a infecção causada por EIEC e *Shigella* spp. é inicialmente caracterizada pela ocorrência de diarreia aquosa, que pode ser seguido ou não de episódios de diarreia com presença sangue e muco, caracterizando a disenteria (NATARO; KAPER, 1998). A doença geralmente é autolimitante, especialmente quando causada por EIEC, porém podem ocorrer complicações severas em decorrência da infecção e intensa colite causada pelas espécies de *Shigella* spp. tais como ulceração da mucosa e perfuração intestinal (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Nos cães com a doença inflamatória intestinal relatada anteriormente, os sinais clínicos variavam desde a eliminação de fezes sanguinolentas a ocorrência de diarreia aquosa, todos os casos com duração persistente, cuja remissão ocorreu após a eliminação dos agentes (MANCHESTER et al., 2013).

A pesquisa da ocorrência da diarreia aquosa e/ou disenteria bacilar provocados por EIEC e *Shigella* spp. pode ocorrer pela detecção da presença de genes de patogenicidade codificadores de importantes fatores relacionados a invasividade dos agentes, como o gene do antígeno H do plasmídeo de invasão (*ipaH*) ou o gene do *locus* associado a invasão (*ial*) (CROXEN et al., 2013). Existem alguns testes bioquímicos específicos que possibilitam o correto diagnóstico do agente etiológico da infecção causada por *Shigella* ou *E. coli* enteroinvasiva, como motilidade e fermentação da lactose, apesar de existir a chance de isolados dos diferentes patógenos apresentarem os mesmos resultados ao teste (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Nesse aspecto, a realização de análises genotípicas, como o MLST, são os métodos que melhor discriminam os agentes (CROXEN et al., 2013).

1.1.7 *Escherichia coli* difusamente aderente (DAEC)

Definida como um patotipo distinto dos demais, *E. coli* difusamente aderente é assim classificada por ligar-se em toda a superfície de células Hep-2 e HeLa cultivadas, representando um padrão de aderência difusa (DA). O patotipo tem sido identificado principalmente em amostras fecais de crianças entre 18 meses e 5 anos, saudáveis ou diarreicas, de países

desenvolvidos e em desenvolvimento (LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006). Todavia, apesar da identificação do agente em fezes de pacientes diarreicos, não existe uma clara associação entre a presença do patótipo e/ou determinados fatores de patogenicidade e a ocorrência da diarreia (BERNET-CAMARD, 1996; CROXEN et al., 2013). Dados quanto a forma de transmissão do agente, principais reservatórios e isolamento em animais são igualmente desconhecidos (CROXEN et al., 2013).

Foram identificados diversos tipos de adesinas que podem ser encontradas em estirpes do patótipo DAEC, das quais duas são responsáveis pela característica fenotípica que classifica o patótipo (F1845 e AIDA-I) (LOPES et al., 2005). A família de operons *afa/dra/daa* sintetizam adesinas fimbriais, como F1845 e Dr e afimbriais, como AfaE-I e AfaE-III, que podem ser encontradas em estirpes causadoras de infecções intestinais, extraintestinais, bem como em isolados de indivíduos saudáveis (BILGE et al., 1989; LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006). Adicionalmente, existe a adesina envolvida com a aderência difusa (AIDA-I), sintetizada a partir de genes plasmidiais (*aidA*) (BENZ; SCHMIDT, 1992). Caracterizada como uma proteína autotransportadora (AT) da membrana externa e produzida pelo sistema de secreção do tipo V (SST5), a adesina AIDA-I possui a função de facilitar a colonização e sobrevivência bacteriana, podendo estar associado a um maior potencial patogênico da bactéria (VO et al., 2017). Inicialmente descrita em isolados de crianças com diarreia por DAEC, a adesina AIDA-I pode também ser encontrada em isolados de suínos associados a diarreia da pós-desmama (ETEC) e doença do edema (EHEC/STEC) (CÔTÉ et al., 2012; SERVIN, 2014).

As adesinas AfaE, Dr e F1845 ligam-se principalmente aos receptores DAF (fator de aceleração de decaimento) presentes na superfície apical das células epiteliais, cuja função está relacionada a proteção da célula contra danos que possam ser causados pelo sistema do complemento (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006). Com a adesão ocorre o estímulo a uma cascata de eventos que podem resultar no rearranjo do citoesqueleto, destruição ou alteração das microvilosidades, o que pode diminuir a capacidade absorptiva dos enterócitos. Efeitos como o desenvolvimento de longas extensões celulares que envolvem as bactérias aderentes podem ocorrer, conforme demonstrado na figura 1.2. (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Alguns estudos demonstraram que DAEC pode promover o aumento de permeabilidade paracelular por alterações nas proteínas associadas a junção de oclusão, podendo contribuir com a ocorrência de diarreia (CROXEN et al., 2013; LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006). Adicionalmente, achados sugerem que DAEC pode estar envolvida com o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas do intestino, como a Doença de Crohn. De fato, a ligação das adesinas ao DAF é seguido de uma intensa resposta pró-inflamatória, com a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) e grande produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-8, TNF- α e IL-1 β . Tais achados são seguidos de maior expressão dos receptores DAF, que juntamente ao MHC-I são bastante expressos na superfície dos enterócitos, achado comum em pacientes com a Doença de Crohn (LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006).

Considerando as alterações promovidas pelo patógeno, a diarreia provocada por DAEC é predominantemente aquosa, podendo tornar-se persistente. É sugerido que os adultos sejam carreadores assintomáticos e que o carreamento do agente possa induzir o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas, como a Doença de Crohn (CROXEN et al., 2013; LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006). Apesar da caracterização fenotípica do agente, não existem métodos universais que permitam a identificação de apenas estirpes DAEC causadoras de

diarreia, o que requer mais estudos epidemiológicos que caracterizem melhor o agente (CROXEN et al., 2013). Para uma provável identificação de estirpes patogênicas de DAEC, podem ser pesquisados uma série de genes possivelmente associados a virulência e fenótipo do agente, como *aidA*, *daaC* e *daaE* (CROXEN et al., 2013; LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006; LOPES et al., 2005).

1.2 PATOTIPOS E FILOGRUPOS DE *E. coli* EM CÃES E RÉPTEIS

Os patotipos diarreio gênicos de *E. coli* já identificados em amostras fecais de cães são ETEC, EPEC, STEC/EHEC, NTEC, EIEC e EAEC (ALMEIDA et al., 2012, BEUTIN et al., 1999; MANCHESTER et al., 2013; PUNÕ-SARMIENTO et al., 2013). Apesar da possível detecção desses patotipos em amostras clínicas de cães com diarreia, estudos têm demonstrado que, até o momento, apenas os patotipos ETEC e EPEC podem ser considerados potenciais causadores de infecções intestinais em cães (ALMEIDA et al., 2012, DROLET et al., 1994; MARKS; KATHER, 2003). Tal fato se deve à identificação dos demais patotipos em amostras clínicas de animais saudáveis em proporções similares à detecção em material fecal de cães diarreicos, o que tem impossibilitado a realização de inferências quanto ao papel desses organismos como causadores de doenças intestinais em cães. Todavia, não é descartada a possibilidade de atuação desses microrganismos como causadores de diarreia. De fato, dentre os agentes causadores de diarreia pesquisados em amostras clínicas de cães diarreicos, alguns estudos demonstraram a apenas a presença de NTEC (STARCIC et al., 2002), enquanto a toxina Stx2 de STEC foi identificada com grande frequência apenas em isolados de animais diarreicos no estudo de HAMMERMUELLER et al (1995), sugerindo assim a possível associação entre esses patotipos e a diarreia em cães.

Apesar da atuação de ETEC como potencial agente etiológico de infecções intestinais em cães, são escassos e desatualizados os estudos que relatam a frequência ou incidência da colibacilose por *E. coli* enterotoxigênica nesses animais. Até o momento, os relatos existentes apontam uma prevalência de diarreia por ETEC em cães que variam de 2,7% a até 31,1% (HAMMERMUELLER et al., 1995; OLSON et al., 1985). Por outro lado, diversos estudos atuais apontam para a grande frequência de isolamento de estirpes EPEC em amostras clínicas de cães, cuja presença associa-se, em diversos estudos, à ocorrência da diarreia nesses animais (COURA et al., 2018; GOFFAUX et al., 2000; PUNÕ-SARMIENTO et al., 2013; SANCAK et al., 2004). Nesse aspecto, os estudos demonstram uma frequência de isolamento de EPEC em até 34% dos cães com diarreia por esse agente (SANKAK et al., 2004; TURK et al., 1998)

Estudos que avaliaram a distribuição filogenética de isolados de *E. coli* em fezes de cães saudáveis demonstraram que os filogrupos encontrados com maior frequência são B1, B2 e A (LIU et al., 2017; MATEUS et al., 2013; SCHMIDT et al., 2015). Por outro lado, foi demonstrado no estudo realizado por COURA et al. (2018) que, igualmente aos isolados de outras espécies animais, estirpes diarreio gênicas de *E. coli* isoladas de cães comumente agrupam-se aos filogrupos B1 e E.

Contrário ao descrito em animais endotérmicos, a frequência de isolamento de *E. coli* em animais de sangue frio, o que inclui os répteis, não é elevada, sendo influenciado principalmente pela dieta e contato com outros animais (GORDON; COWLING, 2003; TENAILLON et al., 2010). Apesar da existência de trabalhos que visem a detecção do agente em répteis, não foram realizados estudos que tenham investigado a presença de fatores ou genes

de patogenicidade dos isolados de *E. coli* em répteis, sendo desconhecido, portanto, o potencial reservatório de cepas patogênicas por animais. Por outro lado, apenas um trabalho realizou a caracterização filogenética de isolados de *E. coli* nesses animais, demonstrando que o principal filogruppo encontrado foi o B1 (GORDON, COWLING, 2003)

1.3 COMENTÁRIOS FINAIS

E. coli causadora de diarreia em animais e seres humanos pode ser classificada em diversos patotipos, caracterizados conforme a presença de determinados fatores de patogenicidade, geralmente associados a ocorrência de diarreia em seus hospedeiros por mecanismos diversos. Além do potencial diarreio gênico aos diversos hospedeiros pelos diferentes patotipos de *E. coli*, os animais e seres humanos podem ser carreadores assintomáticos de determinados patotipos de *E. coli*, representando um risco a população susceptível às doenças, incluindo os seres humanos. São exemplos os bovinos, principais reservatórios de EHEC/STEC, que são altamente patogênicos aos homens; os suínos, que podem carrear estirpes NTEC-1 de mesmos sorogrupos que os isolados de seres humanos, responsáveis por infecções extraintestinais; bem como os cães, cujo estreito convívio com os seres humanos e a existência de relatos quanto ao seu potencial reservatório de patotipos de *E. coli* como STEC/EHEC, EPEC e, principalmente, NTEC-1 pode torná-los importantes fontes de infecção para as pessoas.

Nesse aspecto, é sabido que fezes de animais podem ser fontes de transmissão de agentes patogênicos para os seres humanos, contribuindo com a alta incidência de síndromes como a diarreia, cuja ocorrência pode ser potencializada pelo maior contato entre os animais e seres humanos. Dessa forma, é importante que sejam realizadas investigações quanto ao papel de diferentes animais domiciliados como carreadores de estirpes patogênicas de *E. coli*, avaliando-se o seu potencial reservatório dos agentes em diferentes condições de criação. O diagnóstico de diferentes patotipos de *E. coli* através da identificação de marcadores de virulência, como a detecção de genes que codificam importantes fatores de patogenicidade através de reações de PCR, tem se mostrado extremamente eficaz e acurado, sendo uma ferramenta útil para a vigilância dos patotipos.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, P. M. P. De et al. Characterization of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) isolated from dogs. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 158, n. 3–4, p. 420–424, 2012.
- ARAI, L. R. et al. Zoonotic potential of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) isolated from puppies with diarrhoea in Brazil. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 227, p. 45–51, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.10.023>>
- BARDIAU, M.; SZALO, M.; MAINIL, J. G. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 41, n. 5, 2010.
- BENZ, I.; SCHMIDT, M. A. AIDA α I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. 1539–1546, 1992.
- BERNET-CAMARD, O. Pathogenicity of the Diffusely Adhering Strain *Escherichia coli* C1845: F1845 Adhesin-Decay Accelerating Factor Interaction, Brush Border Microvillus Injury, and Actin Disassembly in Cultured Human Intestinal Epithelial Cells. [s. l.], v. 64, n. 6, p. 1918–1928, 1996.
- BEUTIN, L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats Lothar Beutin To cite this version: Review article *Escherichia coli*. [s. l.], v. 30, p. 285–298, 1999.
- BILGE, S. S. et al. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 171, n. 8, p. 4281–4289, 1989.
- BLANCHARD, P. C. Diagnostics of Dairy and Beef Cattle Diarrhea. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 443–464, 2012.
- BLASER, A. R.; DEANE, A. M.; FRUHWALD, S. Diarrhoea in the critically ill. **Current Opinion in Critical Care**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 142–153, 2015.
- BOUGUÉNEC, C. LE et al. Characterization of AfaE Adhesins Produced by Extraintestinal and Intestinal Human. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 1738–1745, 2001.
- CASANOVA, N. A. et al. Overview of the role of Shiga toxins in porcine edema disease pathogenesis. **Toxicon**, v. 148, p. 149–154, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.019>>.

- CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 214–226, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.005>>
- CLERMONT, O. et al. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Applied and environmental microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 10, p. 4555–4558, 2000.
- CLERMONT, O. et al. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 654–662, 2011.
- CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.
- CLERMONT, O.; GORDON, D.; DENAMUR, E. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. **Microbiology (United Kingdom)**, [s. l.], v. 161, p. 980–988, 2015.
- CÔTÉ, J. P. et al. Identification and mechanism of evolution of new alleles coding for the AIDA-I autotransporter of porcine pathogenic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 78, n. 13, p. 4597–4605, 2012.
- COURA, F. M. et al. Detection of virulence genes and the phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 1–6, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782018000200452&lng=en&tlng=en>
- COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: Uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 811–818, 2014.
- COURA, F. M. et al. Phylogenetic Group Determination of *Escherichia coli* Isolated from Animals Samples. **The Scientific World Journal**, [s. l.], v. 2015, p. 1–4, 2015a. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2015/258424/>>
- COURA, F.M. et al Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. **Folia Microbiologica**. v. 62, n. 139-144, 2017.
- CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

- DE RYCKE, J.; MILON, A.; OSWALD, E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): Two emerging categories of human and animal pathogens. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 30, n. 2–3, p. 221–233, 1999.
- DEBROY, C.; MADDOX, C. W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. **Animal health research reviews**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 129–140, 2001.
- DROLET, R. et al. Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog. **Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 87–92, 1994.
- DUBREUIL, J. D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* targeting intestinal epithelial tight junctions: An effective way to alter the barrier integrity. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, n. August, p. 129–134, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.037>>.
- DUBREUIL, J. D.; ISAACSON, R. E.; SCHIFFERLI, D. M. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2016.
- DURIEZ, P. et al. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. **Microbiology-Sgm**, [s. l.], v. 147, n. 2001, p. 1671–1676, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/00221287-147-6-1671>>
- ESCOBAR-PÁRAMO, P. et al. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 1085–1094, 2004.
- ETHELBERG, S. et al. Risk factors for diarrhea among children in an industrialized country. **Epidemiology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 24–30, 2006.
- FARFAN, M. J.; TORRES, A. G. Molecular mechanisms that mediate colonization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 903–913, 2012.
- FRANKEL, G. et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 911–921, 1998.
- GAASTRA, W.; SVENNERHOLM, A. M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. 11, p. 444–452, 1996.
- GOFFAUX, F. et al. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. **Research in Microbiology**, [s. l.], v. 151, n. 10, p. 865–871, 2000.

- GORDON, D. M. The Influence of Ecological Factors on the Distribution and the Genetic Structure of *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 1–14, 2004. Disponível em: <<http://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.6.4.1>>
- GORDON, D. M. et al. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: Multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 2484–2496, 2008.
- GORDON, D. M.; COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: Host and geographic effects. **Microbiology**, [s. l.], v. 149, n. 12, p. 3575–3586, 2003.
- GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L. et al. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Fourth ed. Iowa, 2010. p. 267–308.
- HAMMERMUELLER, J. et al. Detection of Toxin Genes in *Escherichia coli* Isolated from Normal Dogs and Dogs with Diarrhea Jutta. **Can J Vet Res**, [s. l.], v. 59, p. 265–270, 1995.
- HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 254, n. 1, p. 12–18, 2006.
- HENDERSON, I. R. et al. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 67, n. 11, p. 5587–5596, 1999.
- HOGG, R. A. et al. Probable zoonotic transmission of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 by dogs. **Veterinary Record**, [s. l.], v. 164, p. 2–3, 2009.
- HUBBARD, K. et al. Risk of vomiting and diarrhoea in dogs. **Veterinary Record**, [s. l.], v. 161, n. 22, p. 755–757, 2007.
- JOHNSON, J. R. et al. Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express *papG* allele III. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 3327–36, 2000.
- JOHNSON, J. R. et al. Phylogenetic Distribution of Extraintestinal Virulence-Associated Traits in *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 183, n. 1, p. 78–88, 2001. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/317656>>
- JOHNSON, J. R.; CLABOTS, C. Sharing of Virulent *Escherichia coli* Clones among Household Members of a Woman with Acute Cystitis. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 43, n. 10, p. e101–e108, 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/508541>>

- JOHNSON, J. R.; STELL, A. L.; DELAVARI, P. Canine Feces as a Reservoir of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 1306–1314, 2001.
- JOHNSON, T. J. et al. Pyrosequencing of the Vir plasmid of necrotoxicogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 144, n. 1–2, p. 100–109, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.022>>
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 2, p. 123–140, 2004.
- KLEIN-JÖBSTL, D.; IWERSEN, M.; DRILLICH, M. Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: A case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 97, p. 1–10, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7695>>
- KNUST, Z.; SCHMIDT, G. Cytotoxic necrotizing factors (CNFs)-a growing toxin family. **Toxins**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 116–127, 2010.
- KUSUMOTO, M. et al. Emergence of a Multidrug-Resistant Shiga Toxin-Producing Enterotoxigenic. [s. l.], v. 54, n. 4, p. 1074–1081, 2016.
- LAN, R. et al. Molecular Evolutionary Relationships of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 72, n. 9, p. 5080–5088, 2004.
- LE BOUGUÉNEC, C.; SERVIN, A. L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Hitherto unrecognized pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 256, n. 2, p. 185–194, 2006.
- LIU, X. et al. Association between virulence profile and fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in China. **J Infect Dev Ctries**, v. 11, n. 4, p. 306–313, 2017.
- LOPES, L. M. et al. Heterogeneity among Strains of Diffusely Adherent *Escherichia coli* Isolated in Brazil Heterogeneity among Strains of Diffusely Adherent *Escherichia coli* Isolated in Brazil. **Society**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 1968–1972, 2005.
- MAGDESIAN, K. G. Neonatal foal diarrhea. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 295–312, 2005.
- MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 152, n. 1–2, p. 2–12, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.032>>

- MANCHESTER, A. C. et al. Association between Granulomatous Colitis in French Bulldogs and Invasive *Escherichia coli* and Response to Fluoroquinolone Antimicrobials. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 56–61, 2013.
- MARKS, S. L.; KATHER, E. J. Bacterial-associated diarrhea in the dog: A critical appraisal. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 1029–1060, 2003.
- MATEUS, L.; HENRIQUES, S.; MERINO, C. Virulence genotypes of *Escherichia coli* canine isolates from pyometra, cystitis and fecal origin. **Veterinary Microbiology**, v. 166, p. 590–594, 2013.
- MICENKOVÁ, L. et al. Human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains differ in prevalence of virulence factors, phylogroups, and bacteriocin determinants. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–8, 2016.
- NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 295, p. 443–454, 2005.
- NAKAZATO, G. et al. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: Characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 101, n. 4, p. 269–277, 2004.
- NATARO, J.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 142–201, 1998.
- NGUYEN, Y.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 2, n. July, p. 1–7, 2012. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2012.00090/abstract>>
- OCHMAN, H. Standard Reference Strains of *Escherichia coli* from. [s. l.], v. 157, n. 2, p. 690–693, 1984.
- OLSON, P. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and *Klebsiella pneumoniae* isolated from dogs with diarrhoea. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 577–589, 1985.
- ORDEN, J. A. et al. Necrotoxicogenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the *eae* and *ehxA* genes. **International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, Spain, v. 10, n. 1, p. 47–55, 2007.
- ORSKOV, I. et al. O, K, H and fimbrial antigens in *Escherichia coli* serotypes associated with pyelonephritis and cystitis. **Scandinavian journal of infectious diseases. Supplementum**, England, v. 33, p. 18–25, 1982.

- PUÑO-SARMIENTO, J. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 166, n. 3–4, p. 676–680, 2013.
- RODRIGUES, J. et al. Concurrent Infection in a Dog and Colonization in a Child with a Human Enteropathogenic *Escherichia coli* Clone Concurrent Infection in a Dog and Colonization in a Child with a Human Enteropathogenic *Escherichia coli* Clone. [s. l.], v. 42, n. 3, p. 1388–1390, 2004.
- SABOL, V. K.; CARLSON, K. K. Diarrhea Applying Research to Bedside Practice. **AACN advanced critical care**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 76–87, 2007.
- SÆVIK, B. K.; SKANCKE, E. M.; TRANGERUD, C. A longitudinal study on diarrhoea and vomiting in young dogs of four large breeds. **Acta Veterinaria Scandinavica**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 8, 2012. Disponível em: <<http://www.actavetscand.com/content/54/1/8>>
- SANCAK, A. A. et al. Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea. [s. l.], v. 154, p. 101–106, 2004.
- SARANTUYA, J. et al. Typical Enteraggregative *Escherichia coli* Is the Most Prevalent Pathotype among *E. coli* Strains Causing Diarrhea in Mongolian Children Typical Enteraggregative *Escherichia coli* Is the Most Prevalent Pathotype among *E. coli* Strains Causing Diarrhea in . **Society**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 133–139, 2004.
- SCHMIDT, V. M. et al. Antimicrobial resistance risk factors and characterisation of faecal *E. coli* isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 119, n. 1–2, p. 31–40, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.01.013>>.
- SEKSE, C. et al. Potentially human-pathogenic *Escherichia coli* O26 in Norwegian sheep flocks. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 77, n. 14, p. 4949–4958, 2011.
- SERVIN, A. L. Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Current insights and future challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 823–869, 2014.
- STARČIČ, M. et al. Haemolytic *Escherichia coli* isolated from dogs with diarrhea have characteristics of both uropathogenic and necrotoxigenic strains. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 85, n. 4, p. 361–377, 2002.
- TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 207–217, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2298>>
- TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. Doenças Microbianas do Sistema Digestório. In: ARTMED (Ed.). **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre. p. 705–742.

- TURK, J. et al. Examination for heat-labile, heat-stable, and Shiga-like toxins and for the *eaeA* gene in *Escherichia coli* isolates obtained from dogs dying with diarrhea: 122 cases (1992-1996). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 11, p. 1735–1736, jun. 1998.
- UBER, A. P. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 256, n. 2, p. 251–257, 2006.
- VAN BOST, S. et al. Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 311–320, 2001.
- VEILLEUX, S.; DUBREUIL, J. D. Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. **Vet. Res.**, [s. l.], v. 37, p. 3–13, 2006.
- VIJAY, D. et al. Characterization and biofilm forming ability of diarrhoeagenic enteroaggregative *Escherichia coli* isolates recovered from human infants and young animals. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], v. 38, p. 21–31, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2014.11.004>>
- VO, J. L. et al. Autotransporter Adhesins in *Escherichia coli* Pathogenesis. **Proteomics**, [s. l.], v. 17, n. 23–24, 2017.
- WASTESON, Y. et al. Heat-stable-enterotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dogs. **Journal of clinical microbiology**, [s. l.], v. 26, n. 12, p. 2564–2566, 1988. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=266947&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>
- WHITTAM, T. S.; OCHMAN, H.; SELANDER, R. K. Multilocus genetic structure in natural populations of. [s. l.], v. 80, n. March, p. 1751–1755, 1983.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); THE UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF). Diarrhoea: why children are still dying and what can be done, 59p., 2009.
- ZAMBRANO, L. D. et al. Human diarrhea infections associated with domestic animal husbandry: A systematic review and meta-analysis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 108, n. 6, p. 313–325, 2014.
- ZHOU Z. et al. An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin 1 (EAST1), **Epidemiol. Infect.** v. 128, p. 363–371, 2002.

2. CAPÍTULO UM: CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *E. coli* ISOLADAS DE FEZES DE CÃES ALIMENTADOS COM RAÇÃO E COM DIETA CASEIRA

2.1 RESUMO

O estreito contato entre cães e os seus proprietários vem sendo acompanhado de uma crescente adesão a práticas alimentares alternativas desses animais, que consiste no fornecimento de alimentos não processados, muitas vezes preparados pelos próprios tutores. Todavia, pouco se sabe sobre os riscos que o fornecimento desses alimentos, denominados “naturais” ou “não convencionais”, podem oferecer a saúde dos cães e principalmente dos seres humanos em contato com esses animais. O presente estudo teve como objetivo isolar *E. coli* de material fecal coletado de cães alimentados com diferentes dietas e avaliar o potencial patogênico e diversidade genética dos isolados obtidos. Foram amostradas fezes de 56 cães alimentados a base de ração comercial seca e de 50 cães alimentados com dietas caseiras, dos quais 41 cães ingeriam dieta baseada em produtos cárneos crus e 9 produtos cárneos cozidos. Foram identificados 246 isolados de *E. coli* de fezes coletadas de 101 cães positivos. Os grupos filogenéticos B1 e B2 foram mais comuns em isolados obtidos de cães que se alimentavam de ração (60,4%), sendo a frequência de isolamento de B2 maior nesses animais ($p = 0,0004$). Os filogrupos B1 (33,9%) e E (18,7%) foram os mais comumente isolados em cães que ingeriam alimentos caseiros, existindo uma maior propensão ao isolamento de estirpes do grupo E nesse grupo de cães ($p = 0,009$). Os genes de patogenicidade mais detectados foram os codificadores de CNF1 (78%), EAST1 (45,1%) e intimina (26,8%). Na análise multivariada, foi constatado que cães que ingerem dieta baseada em produtos cárneos crus apresentaram maior propensão a eliminação de isolados portadores de genes de patogenicidade, positivos para o filogrupo E e positivos para os genes de CNF1 e intimina. Dessa forma, o presente estudo sugere que a alimentação de cães baseada em carnes cruas propicia a uma maior eliminação de estirpes de *E. coli* patogênicas de relevante importância para a saúde humana e animal.

2.2 INTRODUÇÃO

Tem-se observado ao longo dos anos o aumento no número de pessoas com animais de estimação, dos quais os cães estão em grande destaque. Adicionalmente, é crescente o contato entre os tutores e seus animais, atualmente considerados, por muitos proprietários, como membros da família (BARKER; WOLEN, 2008). Nesse aspecto, a preocupação com a qualidade e diversidade dos alimentos fornecidos aos cães tem estimulado diversos tutores a aderirem a um tipo de alimentação conhecida como “natural” ou “não convencional”, cuja adesão aumentou consideravelmente na última década (SCHLESINGER; JOFFE, 2011). A alimentação não convencional consiste em uma alternativa aos alimentos industrializados destinados a cães, como a ração, baseando-se em uma dieta não processada, preparada pelos próprios tutores ou adquiridas comercialmente. Em sua composição, apenas ingredientes naturais são utilizados, como vegetais, frutas e, principalmente, carnes, fornecidos crus ou cozidos (MICHEL, 2006; PARR; REMILLARD, 2014).

Diversos estudos têm demonstrado riscos associados ao fornecimento de alimentos não convencionais aos cães, especialmente aqueles cuja composição inclua carnes cruas, reconhecidos como *raw meat-based diets* (RMBDs). Trabalhos apontam uma alta contaminação

desses alimentos *in natura* por microrganismos patogênicos como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Cryptosporidium* spp e patótipos de *E. coli* (LEJEUNE; HANCOCK, 2001; SCHLESINGER; JOFFE, 2011; STROHMEYER, 2006; VAN BREE, 2018). Estudos ainda demonstraram que cães alimentados com dietas baseadas em carnes cruas apresentam uma maior eliminação, pelas fezes, de agentes zoonóticos de grande relevância para a saúde pública, como *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Heidelberg (LEFEBVRE et al., 2008; REIMSCHUESSEL et al., 2017; STROHMEYER, 2006). Tomados em conjunto, tais estudos sugerem que as dietas não convencionais apresentam riscos para os animais e também para os indivíduos em contato com esses pets (STROHMEYER, 2006; WEESE et al., 2005). Considerando tais riscos, diversas entidades de saúde humana e animal, como a *American Veterinary Medical Association* (AVMA), *American Animal Hospital Association* (AAHA), *World Small Animal Veterinary Association* (WSAVA) e *Food and Drug Administration* (FDA) têm se pronunciado contra o fornecimento de alimentos de origem animal crus ou mal cozidos aos cães, tendo em vista o grande risco à saúde humana e animal associado ao maior contato e eliminação de agentes patogênicos (AAHA, 2011; FDA, 2004; FREEMAN et al., 2013; WSAVA; 2015).

Existem diversos estudos que apontam a presença de patótipos diarreio gênicos de *E. coli* em carnes cruas de bovinos, suínos e de frangos destinadas ao consumo humano. (RADU et al., 2001; SAMADPOUR et al., 1994; VAN BREE, 2018; WANG et al., 2017). Por outro lado, ainda é desconhecido se os cães que ingerem alimentos não convencionais, principalmente carnes cruas, apresentam maior carreamento e eliminação destes agentes patogênicos em suas fezes, como já se sabe, por exemplo, quanto as sorovariedades de *Salmonella* spp. (JOFFE; SCHLESINGER, 2002; REIMSCHUESSEL et al., 2017). Sabe-se, até o momento, que cães alimentados com RMBDs apresentam maior diversidade de microrganismos em amostras fecais se comparado a cães que ingerem alimentos convencionais (KIM et al., 2017). Adicionalmente, estudos demonstram que animais alimentados com dietas não convencionais baseadas em carnes cruas apresentam maior eliminação de *E. coli* nas fezes se comparados aos animais alimentados com ração (SCHMIDT et al., 2018), porém não houve um aprofundamento na caracterização desses isolados de forma permitir alguma conclusão quanto aos patótipos eliminados.

Estudos sugerem que alguns patótipos de *E. coli* são responsáveis pela ocorrência de infecções intestinais em cães, sobretudo os patótipos ETEC e EPEC (BEUTIN, 1999; DROLET et al., 1994; MARKS; KATHER, 2003; TURK et al., 1998). Patótipos como EHEC, STEC, NTEC e EAEC já foram encontrados em amostras clínicas de cães saudáveis e diarreicos, mas não há, até o momento, uma clara associação destes agentes etiológicos da diarreia (BEUTIN, 1999; PUÑO-SARMIENTO et al., 2013; STARCIC et al., 2002). Dentre os patógenos diarreio gênicos citados, que são capazes de acometer cães e outros animais como suínos, bovinos e eventualmente aves (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; LUTFUL KABIR, 2010; NAGY; FEKETE, 2005; UBER et al., 2006), apenas ETEC não é considerada zoonótica. Assim, uma eventual ingestão de agentes patogênicos de *E. coli* presentes no alimento *in natura*, seguida de uma possível colonização da mucosa intestinal do animal e eliminação dos patógenos para o ambiente, pode representar riscos à saúde dos cães e de seus tutores. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial patogênico de isolados de *E. coli* obtidos de amostras de fezes de cães alimentados com carnes cruas, cozidas e à base de ração, bem como analisar a diversidade genética dos isolados de *E. coli* nos diferentes grupos de animais estudados.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Coleta de amostras

Uma amostragem não probabilística dos cães de diferentes dietas foi realizada para obtenção dos espécimes clínicos. Foram coletadas amostras de fezes de 56 cães saudáveis alimentados à base de ração e 50 cães saudáveis alimentados com dietas caseiras, dos quais 41 animais eram alimentados com carnes cruas e 9 com carnes cozidas (Tabela 2.1). A seleção dos animais cuja dieta é baseada em alimentação caseira ocorreu por meio de divulgação da procura por participantes voluntários realizada em grupos abertos em redes sociais e sabidamente compostos por tutores que aderem à essa prática. Para a amostragem de animais alimentados com ração, espécimes clínicos foram adquiridos de cães saudáveis de tutores, estudantes universitários e veterinários parceiros após divulgação da procura por voluntários para execução do projeto.

As amostras de fezes dos cães foram coletadas imediatamente após a sua evacuação, com o auxílio de sacos plásticos limpos ou pás de coleta, seguido de armazenamento em tubos coletores universal e acondicionamento a 4°C. Na impossibilidade de coleta de amostras de fezes frescas, a obtenção do material ocorreu com a introdução de *swab* e realização de movimentos de rotação na ampola retal dos cães, seguido de armazenamento em tubos com salina estéril e resfriamento a 4 °C, até encaminhamento para o Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG, onde as amostras foram imediatamente processadas. A execução desse estudo foi previamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CETEA) da UFMG, protocolo nº 52/2015.

Tabela 2.1 Relação do número de cães alimentados a base de ração e dieta caseira crua e cozida.

Alimentação	Total (%)
Caseira	50 (47,1)
Crua	41 (38,6)
Cozida	9 (8,4)
Ração	56 (52,8)
Total	106 (100)

2.3.2 Isolamento, identificação e tipagem filogenética de *E. coli*

Após envio ao laboratório, em até 24hrs após a coleta do material fecal, as amostras de fezes e *swabs* foram imediatamente processados. Com o auxílio de alças descartáveis e estéreis, as amostras de fezes foram diluídas em solução salina estéril (proporção 1:3), seguido de estriamento em placas com ágar MacConkey (Difco, USA) (COURA et al., 2015b). Similarmente, a suspensão em solução salina do conteúdo intestinal coletado com o auxílio de *swab* foi semeada em ágar MacConkey (Difco, USA) utilizando-se de alças descartáveis estéreis. Após incubação a 37°C por 18- 24 h em aerobiose, até três unidades formadoras de

colônia (UFC) com aspecto morfológico sugestivo de *E. coli* (colônias de coloração rosa) (COURA et al., 2015b; QUINN et al., 2001) foram isoladas e posteriormente submetidas a extração de DNA conforme o protocolo estabelecido por PITCHER et al. (1989). A verificação da pureza e concentração do DNA extraído das amostras foi realizada por espectrofotometria (SAMBROOK et al., 1989), com padronização da concentração em 50 ng/μL.

A classificação das colônias isoladas como *E. coli* ocorreu com a detecção do gene espécie específico *gadA/B*, por meio de uma PCR padronizada por MCDANIELS et al. (1996). Os isolados confirmados como *E. coli* foram submetidos a PCR quadruplex proposta por CLERMONT et al. (2013) seguido ou não da execução de reações adicionais para identificação de um dos sete grupos filogenéticos da espécie (A, B1, B2, C, D, E ou F) ou do Clado I, uma nova linhagem de *Escherichia* geneticamente semelhante a *E. coli* (LUO et al., 2011). A sequência dos iniciadores, genes pesquisados, tamanhos dos fragmentos amplificados e temperaturas de anelamento das reações estão descritos na tabela 4.1, contida nos anexos.

A PCR quadruplex foi a primeira reação executada para tipificação das amostras, tendo como objetivo a detecção ou não dos genes *chuA*, *yjaA*, *arpA* e do fragmento genético TSPE4.C2, possibilitando assim a identificação dos filogrupos A, B1, B2 e F, conforme a tabela de interpretação 2.2. Reações adicionais para detecção de fragmentos dos genes *trpA* e *arpA* dos filogrupos C e E, respectivamente, foram realizadas caso fosse necessário. Por fim, se o grupo E não foi identificado com a reação adicional após presunção da ocorrência do filogrupo E ou Clado I, existência desta linhagem de *E. coli* foi confirmada com PCR para detecção de clados (CLERMONT et al., 2011).

Todas as reações foram executadas com 2U de GoTaq™ DNA Polymerase (Promega), 0,2 mM de dNTP Mix (Promega) e 1,0 μM de cada par de iniciadores (exceto Acek/ArpA, em que foram utilizados 2,0 μM). Após reação de amplificação em termociclador, os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% com tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1X corado com brometo de etídio a 0,1 μg/μL. A visualização e registro dos fragmentos amplificados foi realizada em transiluminador de luz UV, com posterior análise dos resultados.

Tabela 2.2 Tabela de interpretação dos possíveis resultados e reações adicionais após realização de PCR quadruplex dos isolados geneticamente identificados como *E. coli*.

<i>arpA</i> (400pb)	Quadruplex			Filogrupo	Reação adicional
	<i>chuA</i> (288pb)	<i>yjaA</i> (211pb)	TspE4.C2 (152 pb)		
+	-	-	-	A	Ausente
+	-	-	+	B1	Ausente
-	+	-	-	F	Ausente
-	+	+	-	B2	Ausente
-	+	+	+	B2	Ausente
-	+	-	+	B2	Ausente
+	-	+	-	A ou C	Identificar grupo C com iniciadores para <i>trpA</i>
+	+	-	-	D ou E	Identificar grupo E com iniciadores para <i>arpA</i>
+	+	-	+	D ou E	Identificar grupo E com iniciadores para <i>arpA</i>
+	+	+	-	E ou Clado I	Identificar grupo E com iniciadores para <i>arpA</i> *
-	-	-	+	Desconhecido	Realizar MLST
-	-	+	+	Desconhecido	Realizar MLST
+	-	+	+	Desconhecido	Realizar MLST
+	+	+	+	Desconhecido	Realizar MLST

* Se negativo para o grupo E, confirmar Clado I com iniciadores para a linhagem

2.3.3 Detecção de genes de patogenicidade e caracterização de patotipos de *E. coli*

Os isolados de *E. coli* foram submetidos a reações de PCR para identificação de genes codificadores de importantes fatores de patogenicidade característicos de cada patotipo (CROXEN et al., 2013; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Considerando a diversidade de

adesinas de ETEC e a ausência de caracterização das que ocorrem com maior frequência em isolados de cães, diferentes reações multiplex de PCR foram utilizadas para detecção de seus genes codificadores, de acordo com a tabela 4.2, adicionalmente à pesquisa das enterotoxinas comumente encontradas em ETEC de animais (STaP, STb e LT). Inseridas nessas mesmas reações, importantes genes de patogenicidade que codificam fatores responsáveis pelo desencadeamento de diarreia provocados por EPEC, EHEC e STEC foram pesquisados, sendo eles: intimina (*eae*) e toxinas Shiga 1 (*stx1*) e 2 (*stx2*) (FRANCK et al., 1998; MACÊDO et al., 2007).

Genes que codificam as adesinas Iha (*iha*), Efa1 (*efa1*) e ToxB (*toxB*), que podem estar presentes em estirpes pertencentes aos patótipos EPEC, EHEC e STEC, foram pesquisados conforme a reação estabelecida por TATARCZAK et al. (2005), após confirmação da identificação desses patótipos. Estirpes pertencentes aos patótipos EHEC e STEC foram pesquisadas quanto a presença do gene codificador da enterohemolisina (*ehxA*), conforme SCHMIDT et al. (1995), enquanto os isolados de STEC foram submetidos a reação de PCR para identificação do gene da adesina autoaglutinante (*saa*) (JENKINS et al., 2003). Para a caracterização dos isolados de EPEC como típicos ou atípicos, foram realizadas reações de PCR para detecção do fragmento de DNA pertencente a adesina BFP (GUNZBURG et al., 1995). Estão listados na tabela 4.2 a sequência dos iniciadores, temperaturas de anelamento, tamanho dos produtos amplificados e referências bibliográficas de cada um dos genes de patogenicidade descritos acima.

Similarmente, a pesquisa dos patótipos NTEC, EAEC, EIEC e DAEC ocorreu pela detecção de genes codificadores de importantes fatores de patogenicidade associados à essas estirpes patogênicas. Para a detecção de NTEC-1 e NTEC-2, respectivamente, foram pesquisados os genes *cnf1* e *cnf2* (BLANCO et al., 1996), sendo que as estirpes positivas para o gene *cnf2* foram submetidas a uma reação de PCR para detecção do gene codificador da fímbria F17 (BERTIN et al., 1996). Isolados do patótipo EAEC foram identificados a partir da pesquisa de genes dos fatores AggR, AAF-II, Pet e EAST-1 (TOKUDA et al., 2010; YAMAMOTO; NAKAZAWA, 1997). A detecção de EIEC ocorreu pela pesquisa de um dos genes responsáveis pela codificação de fatores relacionados a invasividade da estirpe, o *ipaH* (ARANDA et al., 2007). Por fim, DAEC foi detectada a partir da pesquisa do gene codificador da adesina envolvida com a aderência difusa (*aidA*), conforme reação descrita por NIEWERTH et al., (2001). As amostras de referência utilizadas como controles positivos para as reações foram: EDL933 (*eae+*, *stx1+*, *stx2+*, *hlyA+*, *iha+*, *toxB+*, *efa1+*), EAEC O42 (*ast1+*, *aggR+*, *aaf+*, *pet+*), B41 (*f41+*, *f5+*, *staP+*), S5 (*f17+*, *cnf2+*), NTEC1 (*cnf1+*), STECLBA05 (*saa+*), E2348/69 (*bfpA+*), PA58 (*aidA+*), EIEC (*ipaH+*), 2568 (*stb+*, *f18+*, *stx2e+*), 2569 (*lt+*, *k88+*), 2570 (*987p+*). Na tabela 4.2, estão apresentadas as sequências dos iniciadores, temperaturas de anelamento, tamanho dos produtos amplificados e referências bibliográficas para detecção dos genes de patogenicidade dos patótipos descritos acima.

2.3.4 Análises estatísticas

As associações estatísticas entre as variáveis categóricas (ração, dieta crua, dieta cozida) e a frequência de isolamento de patótipos e filogrupos de *E. coli* foram estudadas com o auxílio do programa Stata 12® (StataCorp, USA). Foram realizadas análises univariadas com os testes do Qui-quadrado e/ou teste Exato de Fisher. Associações com valores de $p \leq 0,05$ foram

consideradas estatisticamente significativas. Variáveis associadas com valores de $p \leq 0,02$ foram submetidas a análise multivariada com utilização de regressão logística múltipla, modelo de seleção forward (HOSMER; LEMESHOW, 2000).

2.4 RESULTADOS

Dos 106 cães amostrados e alimentados a base de diferentes dietas, 101 foram positivos para pelo menos uma estirpe de *E. coli*. Considerando que foram coletadas até três UFC sugestivas de *E. coli* por animal, ao total foram identificadas 246 estirpes positivas para a espécie (tabela 2.3).

Tabela 2.3. Relação do número de cães amostrados, de cães positivos para *E. coli* nas fezes, e de estirpes de *E. coli* identificadas de acordo com o tipo de alimentação fornecida aos cães.

Alimentação	Amostras (%)	Positivos (%)	<i>E. coli</i> (%)
Caseira	50 (47,1)	47 (46,5)	112 (45,5)
Crua	41 (38,6)	38 (37,6)	88 (35,7)
Cozida	9 (8,4)	9 (8,9)	24 (9,7)
Ração	56 (52,8)	54 (53,4)	134 (54,4)
Total	106 (100)	101 (100)	246 (100)

Todos os sete grupos filogenéticos de *E. coli*, adicionalmente à linhagem Clado I de *Escherichia*, foram encontrados no presente estudo. Conforme os resultados obtidos com as análises da PCR quadruplex, dez estirpes de *E. coli*, isoladas de diferentes grupos de animais, foram designadas como “desconhecido”. Os filogrupos de *E. coli* mais identificados foram B1 (30%) e B2 (25,6%), enquanto o grupo D foi constatado em apenas um isolado. De maneira similar, os grupos B1 e B2 foram os mais comuns em isolados de cães alimentados com ração (60,4%). Foi constatada uma maior frequência de isolamento de estirpes do filogrupo B2 em cães alimentados com ração ($p = 0,0004$) quando comparado à taxa de isolamento em cães que ingeriam alimentos crus e cozidos. Já em cães alimentados com dieta caseira, foram encontrados em maior quantidade os filogrupos B1 (33,9%) e E (18,7%), com maior propensão ao isolamento de estirpes do grupo E nessa categoria de animais ($p = 0,009$) comparando-se aos isolados de cães que ingeriam ração. O número de isolados de cães pertencentes a cada grupo filogenético de acordo com os diferentes tipos de alimentação foi descrito na tabela 2.4.

Tabela 2.4: Relação do número de amostras e grupos filogenéticos de *E. coli* isoladas de cães alimentados com dieta crua, cozida e com ração. Diferentes letras em uma mesma linha significam taxas de eliminação de *E. coli* estatisticamente diferentes aos Testes Exato de Fisher e Qui-quadrado.

Dieta	Grupo Filogenético (%)									Total (%)
	A	B1	B2	C	D	E	F	Clado I	Desconhecido	
Caseira ^a (crua+cozida)	6 (5,3)	38 ^c (33,9)	18 (16)	15 (13,3)	0	21 ^a (18,7)	11 (9,8)	0	3 (2,6)	112 (45,5)
Crua	6 (6,8)	29 (32,9)	9 (10,2)	12 (13,6)	0	19 (21,5)	10 (11,3)	0	3 (3,4)	88 (35,7)
Cozida	0	9 (37,5)	9 (37,5)	3 (12,5)	0	2 (8,3)	1 (4,1)	0	0	24 (9,7)
Ração ^b	4 (2,9)	36 ^d (26,8)	45 ^b (33,5)	17 (12,6)	1 (0,7%)	10 (7,4)	11 (8,2)	3 (2,2)	7 (5,2)	134 (54,4)
Total	10 (4)	74 (30)	63 (25,6)	32 (13)	1 (0,4)	31 (12,6)	22 (8,9)	3 (1,2)	10 (4)	246 (100)

Dos isolados de cães alimentados a base de dieta crua e cozida, 93,7% foram positivos para pelo menos um dos genes de patogenicidade pesquisados, frequência superior ao encontrado em isolados de cães alimentados a base de ração (82,8%) ($p = 0,005$). Os genes de patogenicidade que caracterizam os patótipos de *E. coli* identificados nos isolados dos grupos alimentados com diferentes dietas foram demonstrados na figura 2.1.

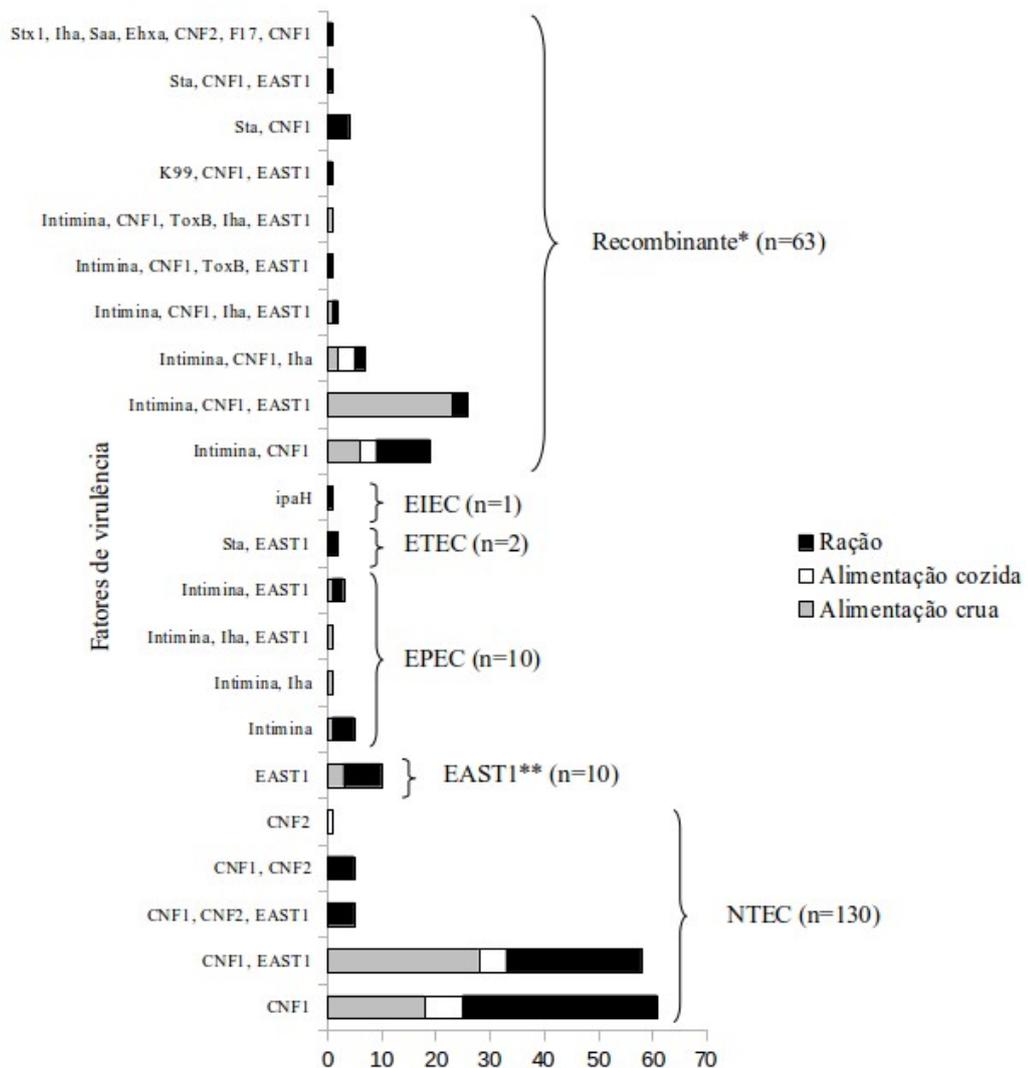


Figura 2.1: Genes de patogenicidade e patotipos identificados em amostras de *E. coli* isoladas das fezes de cães alimentados com dietas cruas, cozidas e a base de ração. *As estirpes carreadoras de genes que codificam fatores de patogenicidade pertencentes a mais de um patotipo de *E. coli* foram classificadas como recombinantes. **Amostras positivas apenas para o gene codificador da toxina EAST1.

Não foram identificadas estirpes portadoras de genes de patogenicidade característicos dos patotipos EAEC e DAEC. Genes que codificam fatores comuns aos patotipos EPEC e STEC, como *eae* e *stx1*, respectivamente, foram detectados juntamente a genes de outros patotipos, como NTEC e ETEC, sendo, portanto, denominados recombinantes. Nesse sentido, foi observado que estirpes classificadas como recombinantes foram mais facilmente isoladas de cães alimentados com dieta caseira se comparado aos alimentados com ração ($p = 0,008$), conforme demonstrado na tabela 2.5.

O gene de patogenicidade do fator EAST-1 (*astA*), encontrado em diversos patotipos de *E. coli*, como ETEC, EPEC, NTEC e em amostras recombinantes, foi mais frequentemente encontrado em isolados de cães alimentados com dietas caseiras ($p = 0,0004$), similarmente ao resultado encontrado para o gene codificador de intimina (*eae*), característico de EPEC e também identificado com grande frequência em estirpes recombinantes ($p = 0,001$). Em nenhum dos isolados positivos para *eae* foi identificado o gene codificador da fimbria BFP. Portanto, todos isolados identificados como EPEC no presente estudo foram classificados como atípicos. Ao calcular-se a associação entre a frequência de identificação do gene *eae* e a presença dos diferentes grupos filogenéticos, foi observada uma tendência ao isolamento de estirpes do filogrupo E carreadoras do gene codificador de intimina ($p = 0,003$). O gene codificador para o fator de patogenicidade CNF-1, comum ao patotipo NTEC e encontrado em estirpes classificadas como recombinantes, foi detectado com maior frequência em isolados de cães alimentados com dietas cruas e cozidas se comparado às estirpes de cães alimentados à base de ração ($p = 0,01$). Por outro lado, o gene codificador de CNF-2 foi detectado com maior frequência em isolados de cães que ingeriam ração (Tabela 2.5).

Tabela 2.5. Análises submetidas ao modelo de regressão logística. Diferentes letras em uma mesma coluna simbolizam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) ao Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher.

Fator ou filogrupo	Dieta		Valor de p
	Caseira ^a (%)	Ração ^b (%)	
Fator de patogenicidade	105 ^a (93,7)	111 ^a (82,8)	0,005
Recombinantes	39 ^a (34,8)	24 ^a (17,9)	0,008
CNF1	97 ^a (86,6)	95 ^a (70,8)	0,01
Intimina	43 ^a (38,3)	23 ^a (17,1)	0,01
EAST1	63 ^a (56,2)	48 ^a (35,8)	0,0004
CNF2	1 ^b (0,8)	11 ^b (8,2)	0,03
Filogrupo E	21 ^a (18,7)	10 ^a (7,4)	0,009
Filogrupo B2	18 ^b (16)	45 ^b (33,5)	0,0004

As associações que obtiveram valores de $p \leq 0,02$ com as análises realizadas pelos testes de Qui-quadrado e Exato de Fisher, demonstrados na tabela 2.5, foram submetidas ao modelo de regressão logística. Nas análises multivariadas, foi observado que cães alimentados com dietas cruas possuem taxas de isolamento de *E. coli* significativamente maiores de estirpes do grupo E, enquanto cães alimentados com ração apresenta maior eliminação de estirpes do filogrupo B2. Cães alimentados com dieta a base de carne crua possuem ainda uma maior tendência ao carregamento de estirpes com genes de patogenicidade e maior presença de estirpes carreadoras dos genes de CNF-1 e intimina, quando comparado a cães alimentados com ração e alimentos cozidos ($p = \leq 0,05$).

2.5 DISCUSSÃO

Diversos estudos sugerem o papel da alimentação, dentre outros fatores, como grandes influenciadores na composição e diversidade da microbiota intestinal (DAVID et al. 2013; GORDON; COWLING, 2003). No presente estudo, os filogrupos de *E. coli* identificados com maior frequência em cães alimentados com ração foram B1 e B2, resultado similar ao descrito em estudos realizados em amostras clínicas de cães saudáveis (LIU et al., 2017; MATEUS et al., 2013; SCHMIDT et al., 2015). Por outro lado, cães alimentados com dietas caseiras apresentaram uma maior abundância dos grupos B1 e E, resultado similar ao encontrado no estudo conduzido por COURA et al (2018), em que foram pesquisados os grupos filogenéticos de *E. coli* patogênica de cães diarreicos. Esse resultado sugere, portanto, que a alimentação caseira crua ou cozida altera a distribuição dos filogrupos de *E. coli* presentes na microbiota de cães. Estudos realizados por ESCOBAR-PÁRAMO et al (2006) demonstraram a influência da dieta dos animais estudados na diversidade e frequência de isolamento dos grupos filogenéticos de *E. coli*. Adicionalmente, sugere-se que a alimentação dos animais, composta principalmente por dietas caseiras, possivelmente propicie a eliminação de linhagens de maior potencial diarreiogênico. Sabe-se que estirpes diarreiogênicas de *E. coli* do patotipo EHEC, as quais tem grande importância zoonótica, concentram-se principalmente dentro do filogrupo E, provavelmente por uma propensão dessa linhagem a adquirir e expressar os genes de patogenicidade associados a esse patotipo (ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004). Dessa forma, uma maior frequência de estirpes do grupo E em isolados de cães que ingeriam dietas caseiras, principalmente os alimentados por carnes cruas, pode representar maior risco a eliminação desses organismos potencialmente patogênicos. A presença de estirpes pertencentes ao filogrupo E, principalmente do patotipo EHEC, já foi demonstrada em produtos cárneos crus de diversas espécies animais destinados ao consumo humano, especialmente de ruminantes, o que pode tornar os cães que se alimentam desses produtos mais propensos a contaminação e eliminação da linhagem (COURA et al., 2015a; LUTFUL KABIR, 2010; RADU et al., 2001; SAMADPOUR et al., 1994; VAN BREE et al., 2018)

É frequente que estirpes B1 sejam encontradas em isolados de *E. coli* em fezes de diversos animais, incluindo cães, o que está em conformidade com os resultados encontrados para os grupos de cães estudados (GORDON; COWLING, 2003; TENAILLON et al., 2010). Ainda, estudos demonstram que *E. coli* isolada de fezes de mamíferos onívoros comumente agrupa-se ao filogrupo B2 (GORDON, COWLING, 2003; TENAILLON et al., 2010), o que está de acordo com os resultados encontrados para os grupos alimentados com ração, tendo em vista a maior detecção de B2 nesses cães ($p = 0,0004$).

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, independentemente da dieta fornecida aos animais, é elevada a taxa de isolamento de *E. coli* carreadora de genes de patogenicidade de amostras fecais de cães. De fato, dos 101 cães positivos para o agente, apenas 5 (4,9%) obtinham isolados negativos para todos os genes pesquisados. Ainda, é notória a frequência elevada de isolados positivos para os genes de CNF1 (78%), EAST1 (45,1%) e intimina (26,8%), cuja taxa de ocorrência foi superior ao demonstrado em alguns trabalhos contidos na literatura (COURA et al., 2018; DERAKHSHANDEH et al., 2018). Apesar da grande eliminação de estirpes carreadoras dos genes de patogenicidade citados por todos os grupos de animais amostrados, é evidente e relevante o fato de a identificação desses agentes ter sido significativamente maior em cães alimentados por dietas caseiras. Nesse sentido, deve-se considerar o potencial patogênico que as estirpes positivas para os genes de CNF-1, intimina e

EAST-1 possuem e os riscos associados à saúde animal e humana, considerando o crescente fornecimento desse tipo de dieta aos animais associado ao maior contato entre os cães e os seus tutores (BARKER; WOLEN, 2008; SCHLESINGER; JOFFE, 2011).

CNF-1, que se enquadra ao patotipo NTEC-1, é responsável por episódios de diarreia em hospedeiros infectados, incluindo seres humanos e os cães, que podem atuar como reservatórios do agente (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999; STARČIĆ et al., 2002). Adicionalmente, deve-se considerar o potencial causador de doenças extraintestinais em animais e seres humanos por estirpes *cnf1*⁺, como quadros de piometra, cistite e meningite, conforme demonstrado por estudos prévios (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; JOHNSON; STEEL; DELAVARI, 2001; WANG; KIM, 2013). EAST-1 é uma enterotoxina termoestável que pode estar associada a diversos patotipos de *E. coli*, como EPEC, EHEC/STEC e ETEC, podendo ainda ser, mesmo de forma isolada, o fator responsável por quadros clínicos entéricos em seres humanos (DUBREUIL; ISAACSON; SCHIFFERLI, 2016; WANG et al., 2017; ZHOU et al., 2002). O gene codificador de intimina, característico do patotipo EPEC e também encontrado com maior frequência em fezes de cães alimentados por dietas caseiras, é responsável pela ocorrência de graves quadros de diarreia aguda em seres humanos (CROXEN et al., 2013). Deve-se destacar, ainda, que estirpes carreadoras de intimina compõe um dos poucos patotipos reconhecidos como causadores de diarreias em cães, juntamente aos patotipo ETEC (ALMEIDA et al., 2012; BEUTIN, 1999). Foi observado, adicionalmente, uma tendência ao isolamento de estirpes positivas para o gene de intimina pertencentes ao filogrupos E. Conforme elucidado anteriormente, é comum que *E. coli* diarriagênicas, como EPEC e EHEC agrupem-se aos filogrupos E, B1 e A. Assim, a maior classificação de estirpes positivas para o gene *eae* ao filogrupos E encontrada no presente estudo corrobora com resultados previamente encontrados (COURA et al., 2017; CHAUDHURI; HENDERSON, 2012; CLERMONT et al., 2011; ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004).

A maior eliminação de isolados positivos para o gene de CNF-1, EAST-1 e intimina por cães alimentados por dietas caseiras pode ter sido favorecida pela presença dessas estirpes nos alimentos ingeridos pelos animais. Estudos demonstram que animais saudáveis, principalmente suínos, podem eliminar em suas fezes estirpes positivas para o gene de CNF-1 (DE RYCKE et al., 1998), que podem ser encontradas em carcaças e produtos cárneos desses animais destinados ao consumo (KADHUM et al., 2006). Adicionalmente, trabalhos demonstram a alta frequência de isolamento de estirpes carreadoras do gene de EAST-1 em produtos cárneos *in natura* de aves, suínos e bovinos destinados ao consumo humano (SUKKUA; MANOTHONG; SUKHUMUNGOON, 2017; WANG et al., 2017). Similarmente, diversos trabalhos apontam para a presença de estirpes positivas para o gene de intimina em carcaças de animais recém abatidos e produtos cárneos destinados ao consumo humano (BAGHERI; GHANBARPOUR; ALIZADE, 2014; KOO et al., 2012; WANG et al., 2017), fator que pode ser influenciado pela eliminação desses patógenos pelas fezes e contaminação da carcaça durante a evisceração (KARIUKI et al., 2002; KAGAMBÈGA et al., 2012).

Ainda, sugere-se que a maior eliminação de estirpes patogênicas de *E. coli* por cães alimentados com dietas caseiras cruas possa ser devido a alterações na composição de sua microbiota intestinal, que sabidamente é influenciada pela dieta ingerida (DAVID et al., 2014; WU et al., 2011). Nesse sentido, estudos demonstraram um aumento na diversidade dos microrganismos bacterianos identificados nas fezes de cães alimentados com dietas não convencionais cruas em comparação aos cães que ingeriam ração, ocasionado provavelmente

por diferenças no processamento e composição nutricional das diferentes dietas (KIM et al., 2017). Além disso, foi demonstrado em estudos prévios uma maior abundância de *E. coli* e frequência de estirpes resistentes às cefalosporinas no material fecal de cães alimentados com carnes cruas (LEFEBVRE et al., 2008; SCHMIDT et al., 2018), fatores que podem ter relação com a maior taxa de isolamento de estirpes patogênicas de *E. coli* encontrado no presente estudo.

Contrário ao resultado observado nos demais fatores de patogenicidade, uma maior taxa de isolamento de estirpes positivas para o gene de CNF-2 foi identificada em cães cuja dieta baseava-se em ração. São poucos os relatos que demonstrem a importância de NTEC-2 ou estirpes positivas para CNF-2 aos seres humanos ou cães, sendo relacionado principalmente a ocorrência de diarreia em bovinos jovens (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; DEBROY; MADDOX, 2001). É curiosa a associação entre isolados portadores do gene *cnf2* e animais alimentados a base de ração, considerando a ausência, em estudos recentes, de resultados que demonstrem a presença de contaminação por *E. coli* patogênica em rações (NEMSER et al., 2014).

Conforme observado na figura 2.1, dos 246 isolados de *E. coli*, 63 (25,6%) obtinham genes codificadores de fatores de patogenicidade relacionados a diversos patótipos diarreogênicos, como NTEC, EPEC, ETEC e STEC, adicionalmente ao gene de EAST-1, sendo portanto classificados como recombinantes. Tal ocorrência é comum a estirpes de *E. coli*, devido a facilidade da espécie em adquirir e perder elementos genéticos móveis, caracterizada pela maior plasticidade de seu genoma, o que muitas vezes dificulta a classificação dos isolados em patótipos específicos (CROXEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; TENAILLON et al., 2010). Nesse sentido, é possível surgimento de estirpes recombinantes com alto potencial de virulência, como é o caso dos isolados de sorotipo O104:H4, associados a um grande surto de colibacilose em países europeus em 2011, provocado por recombinantes de EAEC e STEC (CROXEN et al., 2013). Apesar da significância dessa variável apenas nas análises univariadas, é relevante a observação em que animais que ingerem alimentos caseiros apresentem uma frequência possivelmente maior de eliminação de estirpes recombinantes em suas fezes.

Na análise multivariada foi demonstrado ser significativamente maior a identificação de estirpes carreadoras de genes de patogenicidade em animais alimentados por carnes cruas, sendo os genes de CNF1 e intimina estatisticamente associados a amostras de isoladas cães que ingerem alimentos crus. Portanto, o risco associado ao cão e às pessoas em contato com esses animais possivelmente é maior, levando em consideração a maior eliminação de estirpes portadoras de genes de patogenicidade de grande importância para a saúde humana e animal.

2.6 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que cães que se alimentam de dietas caseiras, principalmente cruas, apresentam uma maior propensão a eliminação de estirpes diarreogênicas de *E. coli*, cujos grupos filogenéticos encontrados com maior frequência diferem dos mais comumente isolados em cães que ingerem ração. Portanto, destaca-se o eventual risco à saúde das pessoas em estreito contato com esses cães, considerando a possibilidade de contato com os

agentes patogênicos através da manipulação de animais. Destaca-se ainda os riscos relacionados a infecção e adoecimento dos próprios cães, que podem ser acometidos pelos agentes diarreiogênicos identificados.

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN ANIMAL HOSPITAL ASSOCIATION (AAHA). **Raw protein diet**. 2011 Website. Disponível em: <https://www.aaha.org/professional/resources/raw_protein_diet.aspx> Acesso em 08 jan. 2019.
- ARANDA, K. R. S. et al. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotixigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **Microbiology letters**, v. 267, n. 2, p. 145-150, 2007.
- ALMEIDA, P. M. P. De et al. Characterization of atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) isolated from dogs. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 158, n. 3-4, p. 420-424, 2012.
- BAGHERI, M.; GHANBARPOUR, R.; ALIZADE, H. Shiga toxin and beta-lactamases genes in *Escherichia coli* phylotypes isolated from carcasses of broiler chickens slaughtered in Iran. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 16-20, 2014.
- BARKER, S. B.; WOLEN, A. R. The Benefits of Human-Companion Animal Interaction: A Review. **Journal of Veterinary Medical Education**, v. 35, n. 4, p. 487-495, 2008.
- BERTIN, Y. et al. Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. **JCM**, v. 34, n. 12, p. 2921-2928, 1996.
- BEUTIN, L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. **Veterinary Research**, v. 30, n. 2-3, p. 285-298, 1999.
- BLANCO, M. et al. Polymerase chain reaction for detection *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, p. 95-101, 1996.
- CHAUDHURI, R.R., HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 214-226, 2012
- CLERMONT, O. et al. Characterization of the cryptic *Escherichia coli* lineages: rapid identification and prevalence. **Environ Microbiol**, v. 13, p. 2468-2477, 2011.
- CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environ Microbiol**, v. 5, n. 1, p. 58-65, 2013.
- COURA, F. M. et al. Detection of virulence genes and the phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 1-6, 2018. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782018000200452&lng=en&tlng=en>

COURA, F.M et al. Phylogenetic Group of *Escherichia coli* Isolates from Broilers in Brazilian Poultry Slaughterhouse. **TheScientificWorldJournal** v. 2017, 2017.

COURA, F. M. et al. Phylogenetic Group Determination of *Escherichia coli* Isolated from Animals Samples. **The Scientific World Journal**, [s. l.], v. 2015, p. 1–4, 2015a. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2015/258424/>>

COURA, F. M. et al. Longitudinal study of Salmonella spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 1, p. 3–11, 2015b.

COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: Uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 811–818, 2014.

CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

DAVID, L. A. et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559-563, 2013.

DE RYCKE, J.; MILON, A.; OSWALD, E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): Two emerging categories of human and animal pathogens. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 30, n. 2–3, p. 221–233, 1999.

DEBROY, C.; MADDOX, C. W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. **Animal health research reviews**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 129–140, 2001.

DERAKHSHANDEH, A. et al. Virulence factors, antibiotic resistance genes and genetic relatedness of commensal *Escherichia coli* isolates from dogs and their owners. *Microbial Pathogenesis*, [s. l.], v. 116, n. April 2017, p. 241–245, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.041>>

DROLET, R. et al. Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog. **Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 87–92, 1994.

DUBREUIL, J. D.; ISAACSON, R. E.; SCHIFFERLI, D. M. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2016.

ESCOBAR-PÁRAMO, P. et al. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 6, p. 1085–1094, 2004.

ESCOBAR-PÁRAMO, P. et al. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1975–1984, 2006.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry: Manufacture and Labeling of Raw Meat Foods for Companion and Captive Noncompanion Carnivores and Omnivores. 2004. Disponível em: <
<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM052662.pdf>>. Acesso em 8 jan. 2019.

FRANCK, S. M. et al. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1795–7, 1998.

FREEMAN, L. M. et al. Current knowledge about the risks and benefits of raw meat-based diets for dogs and cats. **Javma**, v. 243, n. 11, p. 1549–1558, 2013.

GORDON, D. M., COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: Host and geographic effects. **Microbiology**. v. 149, n. 12, p. 3575–86, 2003.

GUNZBURG, S. T. et al. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. **JCM**, v. 33, n. 5, p. 1375–1377, 1995

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L. et al. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Fourth ed. Iowa, 2010. p. 267–308.

HOSMER JR., D. W.; LEMESHOW, S. **Applied logistic regression**. Second Edition, New York: John Wiley& Sons, 2000. 375 p.

JENKINS, C. et al. Distribution of the saa gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. **JCM**, v. 41, n. 4, p. 1775–1778, 2003.

JOFFE, D. J., SCHLESINGER, D. P. Preliminary assessment of the risk of Salmonella infection in dogs fed raw chicken diets. **Can Vet J**, v. 43, p. 441–442, 2002.

JOHNSON, J. R.; STELL, 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.

- KADHUM, H. J. et al. Characteristics of cytotoxic necrotizing factor and cytolethal distending toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from meat samples in Northern Ireland. **Food Microbiology**, v. 23, n. 5, p. 491–497, 2006.
- KAGAMBÈGA, A. et al. Characterization of Salmonella enterica and Detection of the Virulence Genes Specific to Diarrheagenic *Escherichia coli* from Poultry Carcasses in Ouagadougou, Burkina Faso. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 7, p. 589–593, 2012. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2011.1071>>.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 2, p. 123–140, 2004.
- KARIUKI, S. et al. Carriage of Potentially Pathogenic *Escherichia coli* in Chickens. **Avian Diseases**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 721–724, 2002.
- KIM, J. et al. Differences in the gut microbiota of dogs (*Canis lupus familiaris*) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform. **Gut Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2017.
- KOO, H. J. et al. Phylogenetic group distribution and prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from food samples in South Korea. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1813–1816, 2012.
- LEFEBVRE, S. L. et al. Evaluation of the risks of shedding Salmonellae and other potential pathogens by therapy dogs fed raw diets in Ontario and Alberta. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n. 8–10, p. 470–480, 2008.
- LEJEUNE, J. T.; HANCOCK, D. D. Public health concerns associated with feeding raw meat diets to dogs. **Javma**, v. 219, n. 9, p. 1222–1225, 2001.
- LIU, X. et al. Association between virulence profile and fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in China. **J Infect Dev Ctries**, v. 11, n. 4, p. 306–313, 2017.
- LUO, C. et al. Genome sequencing of environmental *Escherichia coli* expands understanding of the ecology and speciation of the model bacterial species. **Proc Natl Acad Sci**, v. 108, p. 7200–7205, 2011.
- LUTFUL KABIR, S. M. Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 1, p. 89–114, 2010.
- MACÊDO, N.R. et al. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 59, n. 5, p. 1117–1123, 2007.

- MARKS, S. L.; KATHER, E. J. Bacterial-associated diarrhea in the dog: A critical appraisal. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 1029–1060, 2003.
- MATEUS, L.; HENRIQUES, S.; MERINO, C. Virulence genotypes of *Escherichia coli* canine isolates from pyometra , cystitis and fecal origin. **Veterinary Microbiology**, v. 166, p. 590–594, 2013.
- MCDANIELS, A. E. et al. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and β -D-glucuronidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3350–3354, 1996.
- MICHEL, K. E. Unconventional Diets for Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 36, n. 6, p. 1269–1281, 2006.
- NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 443–454, 2005.
- NEMSER, S. M. et al. Investigation of Listeria , Salmonella , and Toxigenic *Escherichia coli* in Various Pet Foods. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 706–709, 2014. Disponivel em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2014.1748>>
- NIEWERTH, U. et al. The AIDA Autotransporter System is Associated with F18 and Stx2e in *Escherichia coli* Isolates from Pigs Diagnosed with Edema Disease and Postweaning Diarrhea. **Clin. Vaccine Immunol.** v. 8, p. 143–149, 2001
- PARR, J. M.; REMILLARD, R. L. Handling alternative dietary requests from pet owners. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 44, n. 4, p. 667–688, 2014.
- PITCHER, D.G. et al. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 8, p. 151–156, 1989.
- PUÑO-SARMIENTO, J. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 3–4, p. 676–680, 2013.
- QUINN, P. J. et al. Enterobacteriaceae. In:QUINN, P. J. et al. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. Oxford: Blackwell Science. p. 106-123. 2001.
- RADU, S. et al. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 131–139, 2001.
- REIMSCHUESSEL, R. et al. Multilaboratory Survey To Evaluate Salmonella Prevalence in Diarrheic and Nondiarrheic Dogs and Cats in the United States between 2012 and 2014. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1350–1368, 2017.

- SAMADPOUR, M. et al. Occurrence of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 1038–1040, 1994.
- SAMBROOK, J. et al. **Molecular Cloning: A laboratory manual**, 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2100p.
- SCHLESINGER, D. P.; JOFFE, D. J. Raw food diets in companion animals: A critical review. **Canadian Veterinary Journal**, v. 52, n. 1, p. 50–54, 2011.
- SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157 : H7 strain. **Infection and immunity**, v. 63, n. 3, 1995.
- SCHMIDT, M. et al. The fecal microbiome and metabolome differs between dogs fed Bones and Raw Food (BARF) diets and dogs fed commercial diets. **Plos One**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. e0201279, 2018. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0201279>>
- SCHMIDT, V. M. et al. Antimicrobial resistance risk factors and characterisation of faecal *E. coli* isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 119, n. 1–2, p. 31–40, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.01.013>>.
- STARČIČ, M. et al. Haemolytic *Escherichia coli* isolated from dogs with diarrhea have characteristics of both uropathogenic and necrotoxigenic strains. **Veterinary Microbiology**, v. 85, n. 4, p. 361–377, 2002.
- STROHMEYER, R. A. et al. Evaluation of bacterial and protozoal contamination of commercially available raw meat diets for dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 4, p. 537–542, 2006. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.228.4.537>>.
- SUKKUA, K.; MANOTHONG, S.; SUKHUMUNGOON, P. Seroprevalence and molecular epidemiology of EAST1 gene-carrying *Escherichia coli* from diarrheal patients and raw meats. **Journal of Infection in Developing Countries**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 220–227, 2017.
- TATARCZAK, M. et al. Identification of putative adhesin genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. **Veterinary Microbiology**, v. 110, n. 1-2, p. 77–85, 2005.
- TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 207–217, 2010.
- TOKUDA, K. et al. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in kagoshima, Japan: Biofilm formation and acid resistance. **Microbiology and Immunology**, v. 54, n. 6, p. 320–329, 2010.

- TURK, J. et al. Examination for heat-labile, heat-stable, and Shiga-like toxins and for the *eaeA* gene in *Escherichia coli* isolates obtained from dogs dying with diarrhea: 122 cases (1992-1996). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 11, p. 1735–1736, jun. 1998.
- UBER, A. P. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 256, n. 2, p. 251–257, 2006.
- VAN BREE, F. P. J. et al. Zoonotic bacteria and parasites found in raw meat-based diets for cats and dogs. **The Veterinary record**, v. 182, n. 2, p. 50, 2018.
- WANG, M.-H.; KIM, K. S. Cytotoxic necrotizing factor 1 contributes to *Escherichia coli* meningitis. **Toxins**, v. 5, n. 11, p. 2270–2280, nov. 2013.
- WANG, L. et al. Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 249, p. 44–52, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.003>>.
- WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION'S (WSAVA) WSAVA draws attention to risks of raw meat-based diets. **Veterinary Record**, [s. l.], v. 176, n. 18, p. 451, 2015. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/176/18/451.2.abstract>>
- WEESE, J. S.; ROUSSEAU, J.; ARROYO, L. Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets. **Can Vet J**, v. 46, p. 513–516, 2005.
- WU, G. D. et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**. v. 334, n. 6052, p. 105–108, 2011.
- YAMAMOTO, T.; NAKAZAWA, M. Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea. **JCM**, v. 35, n. 1, p. 223–227, 1997.
- ZHOU Z. et al. An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1), **Epidemiol. Infect.** v. 128, p. 363–371, 2002.

3. CAPÍTULO DOIS: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *E. coli* DE RÉPTEIS

3.1 RESUMO

Considerando a popularidade de répteis como animais de companhia e a sua possível atuação como reservatórios de microrganismos potencialmente patogênicos, os objetivos do presente estudo foram realizar o isolamento de *E. coli* das fezes de répteis do Brasil e caracterizar os isolados obtidos quanto a sua diversidade genética e a presença de genes codificadores de fatores de patogenicidade de estirpes diarreio gênicas de *E. coli*. A coleta das amostras ocorreu com a realização de *swabs* cloacais de 76 répteis, dos quais 15 eram lagartos, 16 quelônios e 45 serpentes, que viviam em ambiente domiciliado, em cativeiro ou eram animais de vida livre. Dos 76 répteis amostrados, 52 foram positivos para *E. coli* (68,4%), com o isolamento de 88 estirpes do agente bacteriano. A frequência de identificação de *E. coli* foi maior em amostras clínicas de serpentes (38/45) e de outros répteis carnívoros (38/46) ($p \leq 0,05$). Dos isolados de *E. coli*, 76 foram positivos para o grupo B1, correspondendo a aproximadamente 89% dos animais (46/52) positivos para esse filogrupo. O gene codificador da toxina EAST-1 foi encontrada em quatro isolados de dois répteis, sendo um isolado de um lagarto domiciliado e outro de vida livre. O gene codificador de CNF-1, fator associado a estirpes de *E. coli* causadoras de diarreia e doenças extraintestinais em seres humanos, foi encontrado em 13 isolados de sete répteis, dos quais dois eram quelônios domiciliados. O presente estudo demonstra que répteis encontrados no Brasil podem carrear estirpes potencialmente patogênicas de *E. coli*, representando possíveis riscos à saúde humana e animal.

3.2 INTRODUÇÃO

Tem-se observado ao longo dos anos um crescente aumento na criação de répteis como animais de companhia. Apenas nos Estados Unidos, entre 2001 e 2016, o número de propriedades com répteis criados como pets, como serpentes, lagartos e testudinos, como cágados e jabutis, aumentou de 1,7 para aproximadamente 4,7 milhões (APPA, 2017), com atualmente quase 4% das propriedades possuindo pelo menos um réptil como animal de companhia (CDC, 2003; APPA, 2017). Nesse aspecto, baseando-se em dados coletados no último senso brasileiro, relacionado a população de animais de companhia, foi constatado que o Brasil possui aproximadamente 2,2 milhões de répteis domesticados, ocupando assim a posição de 9º país com maior população de répteis domiciliados (IBGE,2013).

A crescente proximidade entre répteis e seres humanos tornou-se motivo de preocupação no que se refere a saúde pública, tendo em vista que esses animais podem carrear agentes infecciosos potencialmente zoonóticos, destacando-se diversas sorovariades de *Salmonella enterica*, associadas a salmonelose humana (CDC, 2003; PEDERSON et al., 2009; CORRENTE et al., 2017). De fato, estudos previamente realizados demonstraram uma associação entre a criação de répteis e ocorrência de salmonelose humana, responsável por aproximadamente 6% das enfermidades causadas por *Salmonella* spp. nos Estados Unidos (MERMIN et al., 2004). Adicionalmente, outros agentes patogênicos de potencial zoonótico, como bactérias dos gêneros *Mycobacterium*, *Chlamydia* e *Leptospira* têm sido isolados em répteis (EBANI, 2017).

Apesar de mais comumente isolado de animais endotérmicos, estudos demonstram que estirpes de *E. coli* também podem ser encontradas no trato intestinal de animais de sangue frio, como répteis, ainda que não seja considerado um microrganismo encontrado com grande frequência (TENAILLON et al., 2010). Alguns estudos que realizaram o isolamento e caracterização filogenética de *E. coli* isoladas de répteis demonstraram que o principal filogrupo encontrado foi o B1 (GOPEE et al, 2000; GORDON, COWLING, 2003; WHEELER et al., 2012). Além da existência de relatos que associam o grupo B1 à maior ocorrência em animais, diversos estudos relacionam patotipos diarreio gênicos de *E. coli* a esse filogrupo, sugerindo seu potencial patogênico (CHAUDHURI, HENDERSON, 2012; CLERMONT et al., 2011; ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004). Todavia, não existem estudos relacionados a identificação de fatores de patogenicidade de estirpes diarreio gênicas de *E. coli* em isolados de répteis, que, igualmente a diversas espécies de animais domésticos, possam atuar como reservatórios de patotipos de *E. coli*.

Dessa maneira, considerando a proximidade entre seres humanos e répteis, e a sua possível atuação como reservatórios de estirpes diarreio gênicas de *E. coli* potencialmente patogênicas ao ser humano e ao próprio hospedeiro, o presente estudo tem como objetivo o isolamento e caracterização de estirpes de *E. coli* isoladas das fezes de répteis vivendo em diferentes habitats quanto ao grupo filogenético e patotipo diarreio gênico.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Amostras clínicas

Amostras de fezes foram obtidas com a realização de suabes cloacais de répteis entre julho de 2016 e setembro de 2017. Uma amostragem não probabilística foi realizada em 76 répteis aparentemente saudáveis após realização de exames clínicos prévios. Destes, 60 répteis foram classificados como escamados, pertencentes a ordem Squamata, compreendendo 15 lagartos (subordem Sauria) e 45 cobras (subordem Serpentes). Dezesesseis répteis eram pertencentes a ordem Chelonii, conhecidos como testudinos, da qual fazem parte as tartarugas, cágados e jabutis. Destes, dez animais pertenciam a subordem Pleurodira e seis a subordem Cryptodira (SBH, 2018). Os répteis foram selecionados quanto a existência em diferentes habitats, como animais de vida livre encontrados na região metropolitana de Belo Horizonte e capturados para monitoramento ($n = 37$), animais de cativeiro aleatoriamente selecionados do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) e da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) ($n = 16$) e animais domiciliados de proprietários voluntários à realização deste projeto ($n = 23$) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Relação do número de répteis amostrados (n = 76) conforme o grupo taxonômico, habitat e dieta

Grupo	No. (%) répteis			No. (%) répteis		
	Vida livre	Cativeiro	Pet	Carnívoro	Onívoro	Herbívoro
Ordem: Squamata	33 (43,4)	15 (19,7)	12 (15,7)	46 (60,5)	9 (11,8)	5 (6,5)
Subordem: Serpentes	24 (31,5)	15 (19,7)	6 (7,8)	45 (59,2)	0	0
<i>Bothrops neuwiedi</i>	0	5 (6,5)	0	5 (6,5)	0	0
<i>Bothrops moojeni</i>	0	3 (3,9)	0	3 (3,9)	0	0
<i>Bothrops alternatus</i>	7 (9,2)	1 (1,3)	0	8 (10,5)	0	0
<i>Bothrops jararaca</i>	10 (13,1)	1 (1,3)	0	11 (14,4)	0	0
<i>Crotalus durissus</i>	6 (7,8)	5 (6,5)	0	11 (14,4)	0	0
<i>Epicrates cenchria</i>	0	0	1 (1,3)	1 (1,3)	0	0
<i>Pantherophis guttatus</i>	0	0	4 (5,2)	4 (5,2)	0	0
<i>Python molurus</i>	0	0	1 (1,3)	1 (1,3)	0	0
<i>Sibynomorphus mikanii</i>	1 (1,3)	0	0	1 (1,3)	0	0
Subordem: Sauria	9 (11,8)	0	6 (7,8)	1 (1,3)	9 (11,8)	5 (6,5)
<i>Iguana iguana</i>	0	0	5 (6,5)	0	0	5 (6,5)
<i>Eublepharis macularius</i>	0	0	1 (1,3)	1 (1,3)	0	0
<i>Ameivula cipoensis</i>	6 (7,8)	0	0 (0)	0	6 (7,8)	0
<i>Tropidurus montanus</i>	3 (3,9)	0	0 (0)	0	3 (3,9)	0
Ordem: Chelonii	4 (5,2)	1 (1,3)	11 (14,4)	0	16 (21)	0
Subordem: Cryptodira	0	0	6 (7,8)	0	6 (7,8)	0
<i>Chelonoidis carbonaria</i>	0	0	3 (3,9)	0	3 (3,9)	0
<i>Trachemys dorbigni</i>	0	0	3 (3,9)	0	3 (3,9)	0
Subordem: Pleurodira	4 (5,2)	1 (1,3)	5 (6,5)	0	10 (13,1)	0
<i>Phrynops geoffroanus</i>	4 (5,2)	1 (1,3)	5 (6,5)	0	10 (13,1)	0
Total (%)	37 (48,6)	16 (21)	23 (30,2)	46 (60,5)	25 (32,8)	5 (6,5)

Para amostragem dos répteis, suabes estéreis (BactiSwab; Remel, Lenexa, KA, USA) foram introduzidos à cloaca dos animais em uma profundidade de aproximadamente 5 a 6 cm, seguido de rotação por cinco vezes, retirada e agitação dos *swabs* em tubos contendo solução salina tamponada (PBS) estéril, conforme descrito por IVES et al. (2017). O material coletado foi imediatamente resfriado em caixas de transporte e encaminhado ao Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola de Veterinária da UFMG, para processamento imediato. A realização deste trabalho foi previamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA), sob o protocolo 238/2015, e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), protocolo nº 49195-1.

3.3.2 Isolamento, identificação e tipagem filogenética de *E. coli*

As amostras clínicas suspendidas em solução salina tamponada foram semeadas em ágar MacConkey (Difco, USA) com o auxílio de alças descartáveis estéreis e incubadas a 37°C por 24h em aerobiose. Até três unidades formadoras de colônia (UFC) com aspecto sugestivo de *E. coli* (colônias fermentadoras de lactose) foram identificadas utilizando-se um método bioquímico para detecção de enterobactérias denominado EPM-MILI-Citrato de Simmons (EWING, 1986). Os isolados identificados como *E. coli* foram submetidos a extração de DNA conforme o protocolo estabelecido por PITCHER et al (1989), seguido de verificação da pureza e concentração do DNA extraído das amostras por espectrofotometria (SAMBROOK et al., 1989), e padronização da concentração em 50 ng/μL. Para identificação dos grupos filogenéticos de *E. coli*, foi realizada a PCR quadruplex proposta por CLERMONT et al. (2013), seguido ou não da execução de reações adicionais, conforme a tabela 4.1.

3.3.3 Identificação de genes de patogenicidade e caracterização de patotipos de *E. coli*

Para caracterização de estirpes diarreio gênicas de *E. coli*, os principais genes de patogenicidade relacionados aos patotipos ETEC, EPEC, EHEC, STEC, NTEC, EIEC, DAEC e EAEC foram pesquisados com o auxílio de ensaios de PCR (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; NATARO; KAPER, 1998). Adicionalmente às reações previamente descritas e contidas na tabela 4.2, foram pesquisados genes codificadores para as principais adesinas e toxinas associadas a ETEC causadora de diarreia em seres humanos, conforme descrito por RODAS et al., (2009) (tabela 4.3). As amostras de referência utilizadas como controles positivos para as reações foram: EDL933 (*eae+*, *stx1+*, *stx2+*, *hlyA+*, *iha+*, *toxB+*, *efa1+*), EAEC O42 (*ast1+*, *aggR+*, *aaf+*, *pet+*), B41 (*f41+*, *f5+*, *stxP+*), S5 (*f17+*, *cnf2+*), NTEC1 (*cnf1+*), STECLBA05 (*saa+*), E2348/69 (*bfpA+*), PA58 (*aidA+*), EIEC (*ipaH+*), 2568 (*stb+*, *f18+*, *stx2e+*), 2569 (*lt+*, *k88+*), 2570 (*987p+*), ECSTh (*stxH+*), 4833 (*cs2+*, *cs3+*), PB176 (*cs1+*), E17018A (*cs5+*, *cs6+*), H10407 (*cfal+*), E8775 (*cs4+*) e 29 (*cs12+*).

3.3.4 Análises estatísticas

As associações estatísticas entre as variáveis categóricas (ordem ou subordem, dieta e habitat dos répteis) e a frequência de isolamento de patotipos e filogrupos de *E. coli* foram estudadas com o auxílio do programa Stata 12® (StataCorp, USA). Foram realizadas análises univariadas com os testes do Qui-quadrado e/ou teste Exato de Fisher. Associações com valores de $p \leq 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

3.4 RESULTADOS

E. coli foi isolada das fezes de 52 dos 76 animais amostrados (68,4%), dos quais 38 (50%) foram isolados de serpentes, 7 (9,2%) foram de lagartos, 4 (5,2%) foram de quelônios da subordem Pleurodira e 3 (3,9%) da subordem Cryptodira. Dos 52 animais positivos para *E. coli*, foram obtidos 88 isolados do agente a partir de suas fezes. A frequência de positividade de *E. coli* foi maior em serpentes quando comparado a lagartos ($p = 0,003$), à subordem Pleurodira ($p = 0,002$) e à subordem Cryptodira ($p = 0,04$).

Considerando os grupos filogenéticos de *E. coli*, quase 87% das estirpes isoladas (76/88) foram classificadas como B1, sendo 46 (88,4%) animais positivos apenas para esse filogrupos (Tabela 3.2). Foi identificada uma tendência ao isolamento de estirpes do grupo B1 em serpentes e lagartos ($p = 0,00004$), enquanto estirpes dos grupos A e B2 foram mais frequentes em quelônios ($p = 0,0001$).

Tabela 3.2. Frequência de isolamento de *E. coli* em répteis do Brasil e grupos filogenéticos identificados nos isolados dos animais

Hospedeiro	No. amostras	No. positivos (%)	No. filogrupos <i>E. coli</i> * (%)				
			A	B1	B2	D	F
Serpentes	45	38/45 (84,4)	0	38/38 (100)	0	0	0
Sauria	15	7/15 (46,6)	1/7 (14,2)	5/7 (71,4)	0	0	1/7 (14,2)
Cryptodira	6	3/6 (50)	1/3 (33,3)	2/3 (66,6)	0	0	0
Pleurodira	10	4/10 (40)	0	1/4 (25)	2/4 (50)	1/4 (25)	0
Total	76	52/76 (68,4)	2/52 (3,8)	46/52 (88,4)	2/52 (3,8)	1/52 (1,9)	1/52 (1,9)

* Nenhum isolado de *E. coli* pertenceu aos filogrupos C e E

Quanto aos animais de vida livre e domiciliados, a frequência de identificação de *E. coli* foi, respectivamente, 62,1% e 65,2%. Por sua vez, a frequência de isolamento de *E. coli* das fezes de animais de cativeiro foi de 87,5%, mas não foram encontradas diferenças estatísticas para a positividade de *E. coli* em répteis de diferentes habitats. A identificação de *E. coli* em répteis carnívoros foi maior do que em répteis não carnívoros ($p = 0,0009$) (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Frequência de isolamento de *E. coli* em répteis de acordo com hábitos alimentares e habitats.

Dieta	No. Amostras (%)	No. positivos (%)
Carnívora	46 (60,5)	38/46 (82,6)
Não carnívora	30 (39,4)	14/30 (46,6)
Habitat	No. Amostras (%)	No. positivos (%)
Domiciliado	23 (30,2)	15/23 (65,2)
Cativeiro	16 (21)	14/16 (87,5)
Vida livre	37 (48,6)	23/37 (62,1)

O gene codificador do fator de patogenicidade EAST-1 (*Enteraggregative E. coli heat-stable enterotoxin I*) foi encontrado em isolados de dois répteis (3,8%). Destes répteis, três

estirpes eram pertencentes ao filogrupo F e uma foi classificada como B1, isolada de um lagarto herbívoro (*Iguana iguana*) criado como animal de estimação. Os três isolados pertencentes ao filogrupo F foram também positivos para o gene codificador de CNF1, comum ao patotipo NTEC. Essas estirpes foram isoladas de um lagarto carnívoro e de vida livre. Sete (13,4%) répteis possuíam pelo menos um isolado de *E. coli* positivo para o gene codificador de CNF1, totalizando 13 isolados positivos para o gene (14,7% do total). Destes, oito estirpes foram classificadas como B1 (61,5%), dois como B2 (15,3%) e três como F (23%). A frequência de animais positivos para o gene codificador de CNF1 é demonstrada na tabela 3.4.

Tabela 3.4. Relação de animais positivos para os genes codificadores dos fatores EAST1 e CNF1 de acordo com o filogrupo, hábitos alimentares, habitat, subordem e espécie do hospedeiro positivo.

Subordem	Espécie	Habitat	Dieta	Filogrupo	Fator
Sauria	<i>Iguana iguana</i>	Domiciliado	Herbívora		EAST1
Serpentes	<i>Bothrops neuwiedi</i>	Cativeiro			CNF1
Sauria	<i>Ameivula cipoensis</i>	Vida livre		B1	CNF1
Sauria	<i>Tropidurus montanus</i>	Vida livre	Onívora		CNF1
Pleurodira	<i>Phrynops geoffroanus</i>	Vida livre			CNF1
Pleurodira	<i>Phrynops geoffroanus</i>	Domiciliado	Onívora	B2	CNF1
	<i>Phrynops geoffroanus</i>				CNF1
Sauria	<i>Ameivula cipoensis</i>	Vida livre	Carnívora	F	CNF1 EAST1

3.5 DISCUSSÃO

E. coli é considerada habitante do trato intestinal de mamíferos e outros vertebrados de sangue quente. Em animais ectotérmicos, como os répteis, a taxa de isolamento desse agente bacteriano parece ser altamente dependente de sua dieta e contato com mamíferos, como os seres humanos (GORDON, COWLING, 2013). Estirpes patogênicas de *E. coli* são relatadas como causadoras de doenças intestinais e extraintestinais, em animais e seres humanos e, conforme a identificação de genes codificadores de fatores de patogenicidade específicos, estirpes diarreio gênicas de *E. coli* podem ser classificadas em diferentes patotipos (NATARO, KAPER, 1998). Adicionalmente, *E. coli* pode ser classificada em sete grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E e F) com a execução da PCR quadruplex desenvolvida por CLERMONT et al (2013). Estudos demonstram que os grupos filogenéticos identificados geralmente estão associados ao nicho ecológico, hospedeiro, histórico do hospedeiro e a propensão do microrganismo a indução de doenças (COURA et al., 2017; COURA et al., 2015; GORDON et al., 2008).

No presente estudo, *E. coli* foi isolada em 68,4% dos animais amostrados, frequência de isolamento maior do que o reportado em estudos anteriores realizados em répteis (GOPEE et al.,

2000; GORDON; COWLING, 2003; WHEELER et al., 2012). Essa alta frequência de isolamento de *E. coli* nos répteis amostrados pode ser justificada pela maior proximidade entre esses animais e os seres humanos, considerando que 51,3% (39/76) dos animais amostrados viviam em estreito contato com os seres humanos, seja em ambiente domiciliado ou criados em cativeiro, fator associado a maiores taxas de isolamento do agente (GORDON; COWLING, 2003). Por outro lado, a maior frequência de isolamento de *E. coli* em serpentes, se comparado a outros répteis amostrados no presente estudo, pode estar relacionada a dieta desses animais, uma vez que todas as serpentes eram carnívoras. De fato, foi constatado que répteis carnívoros foram mais propensos ao isolamento de *E. coli* do que herbívoros e onívoros ($p = 0,01$), o que pode ser justificado pela maior exposição destes animais ao agente bacteriano, possivelmente carregado por suas presas. Curiosamente, esse resultado contrasta com o observado em estudos prévios que demonstram que *E. coli* é mais facilmente isolada em mamíferos e pássaros onívoros, explicado pela maior exposição ao agente e o tempo que a digesta permanece no trato intestinal (GORDON, COWLING, 2003).

Todos os isolados de répteis foram classificados em um dos sete grupos filogenéticos de *E. coli*, de acordo com o critério estabelecido por CLERMONT et al. (2013). A alta frequência de estirpes pertencentes ao grupo B1 foi similar ao resultado descrito no estudo de GORDON e COWLING (2003), único trabalho encontrado na literatura que avaliou a distribuição dos grupos filogenéticos entre isolados de *E. coli* de répteis. Esse resultado corrobora, ainda, com trabalhos prévios que relataram a maior taxa de isolamento de estirpes do filogrupo B1 em animais, enquanto em humanos os grupos A e B2 são encontrados com maior frequência (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012). Diferentes grupos filogenéticos estão associados a hospedeiros específicos (COURA et al., 2015). Adicionalmente a identificação do filogrupo de maior ocorrência em animais, o presente estudo demonstrou uma maior propensão ao isolamento de estirpes B1 em isolados de serpentes e lagartos ($p = 0,00004$), conforme demonstrado por GORDON e COWLING (2003). Já os grupos A e B2, comumente relatados em isolados de seres humanos, foram mais frequentes em quelônios ($p = 0,0001$). Curiosamente, todas as amostras identificadas como A ou B2 foram isoladas de répteis domiciliados, tornando questionável se o estreito contato entre répteis e seres humanos pode ter resultado em colonização destes animais por estirpes tipicamente encontradas em pessoas.

Em mamíferos, a distribuição dos grupos filogenéticos é altamente influenciada por fatores como o clima, hábito alimentar e peso corporal do hospedeiro, o que está relacionado à extensão de seu trato intestinal. Estudos prévios observaram que mamíferos carnívoros carregam estirpes do grupo B1 com maior frequência, provavelmente influenciado pela menor complexidade de seu trato intestinal e tempo de retenção da digesta no organismo desses animais (COURA et al., 2015; GORDON; COWLING, 2003). Apesar do presente estudo analisar apenas isolados de répteis, os resultados obtidos indicam que, similarmente ao demonstrado em mamíferos carnívoros, há uma associação entre estirpes do grupo B1 e o seu isolamento em répteis carnívoros ($p = 0,0001$).

Este é o primeiro trabalho que relata a detecção de genes codificadores de fatores de patogenicidade em isolados de *E. coli* de répteis. Apesar da ausência de dados que correlacionem as estirpes diarreio gênicas à dieta dos animais e principalmente ao ambiente em que habitavam, é possível que a detecção desses patótipos de *E. coli* tenha sido favorecida pelo maior contato entre esses animais e os seres humanos. Assim, além de um possível favorecimento a eliminação de *E. coli* por esses animais, é possível que o contato com as

peças tenha favorecido a uma maior exposição a estirpes diarreio gênicas, considerando que os seres humanos podem eliminar, de maneira sintomática ou não, estirpes positivas para os genes de EAST1 e CNF1 (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999; KAPER et al., 2004).

É comum que espécies de animais domésticos eliminem estirpes positivas para o gene codificador de EAST-1, cujo potencial diarreio gênico é ainda desconhecido nesses hospedeiros. Diversos estudos já demonstraram a ocorrência de surtos de diarreia em seres humanos provocados por estirpes positivas apenas para o fator EAST-1 (VILA et al., 1998; ZHOU et al., 2002). Portanto, a presença de estirpes positivas para o gene de patogenicidade de EAST-1 pode ser interpretada como um risco potencial aos seres humanos em estreito contato com esses répteis positivos, especialmente as pessoas mais susceptíveis às infecções, como crianças (SPANNO et al., 2017; VILA et al., 1998). No presente estudo é interessante ressaltar ainda a existência de um lagarto domiciliado positivo para o gene de patogenicidade mencionado, cujo contato com os tutores pode representar riscos à sua saúde.

O gene codificador da citotoxina CNF1 (*cnf1*), importante fator de patogenicidade do patotipo NTEC, responsável por quadros de enterite e infecções extraintestinais em seres humanos e animais domésticos, foi encontrado em isolados de sete répteis. Dessa forma, o presente estudo sugere que répteis possam atuar como potenciais reservatórios desse microrganismo, considerado zoonótico (JOHNSON; CLABOTS, 2006; JOHNSON; STELL; DELAVARI, 2001). Entre os animais positivos para estirpes *cnf1*+, dois são quelônios domiciliados, fator que pode elevar o risco de exposição das pessoas ao agente. Adicionalmente, os isolados desses dois quelônios foram classificados como B2, grupo filogenético comumente associado a *E. coli* causadora de doenças extraintestinais. Dessa maneira, o presente estudo sugere a potencial capacidade dos isolados em causar infecções sistêmicas, considerando a presença do gene de CNF1 e a sabida associação desse fator a doenças extraintestinais em seres humanos e animais domésticos (CLERMONT et al., 2013; JOHNSON et al., 2001). Além do risco associado a saúde pública, o carreamento de estirpes positivas para o gene CNF1 pode significar um risco à saúde dos próprios répteis, levando-se em consideração a existência de relatos que associam o agente a enfermidades intestinais e extraintestinais em animais de outras espécies, como cães e suínos (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1999; STARČIĆ et al., 2002). Todavia, é importante salientar que, até o momento, não existem relatos que demonstrem a detecção do fator CNF1 ou seu gene codificador em amostras clínicas de répteis, tampouco existem trabalhos que associem o patotipo NTEC à ocorrência de enfermidades clínicas nesses animais.

3.6 CONCLUSÕES

A eliminação de estirpes potencialmente patogênicas de *E. coli* por répteis é um achado inédito e sugere que esses animais podem oferecer riscos às pessoas que manipulam espécies dessa classe animal, especialmente aquelas mais vulneráveis, como crianças e pessoas imunossuprimidas. Apesar da ausência de informações quanto aos riscos associados aos répteis, o carreamento de isolados diarreio gênicos servem de alerta também à saúde animal. Dessa forma, estudos futuros são necessários para esclarecer se o carreamento desses enteropatógenos pode representar riscos à saúde dos répteis.

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICA PET PRODUCTS ASSOCIATION [APPA]. The 2017-2018 APPA National Pet Owners Survey. Greenwich, US, 2017.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. Reptile-associated salmonellosis--selected states, 1998-2002. **Morb Mortal Wkly Rep.** 52: 49,1206-1209, 2003.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA [IBGE]. População de animais de estimação no Brasil – 2013. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação, 2013.
- CHAUDHURI, R.R., HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 214–226, 2012.
- CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental microbiology reports**. v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.
- CORRENTE, M. et al. Risk for zoonotic Salmonella transmission from pet reptiles: A survey on knowledge, attitudes and practices of reptile-owners related to reptile husbandry. **Prev Vet Med.** v. 1, n. 146, p. 73-78, 2017.
- COURA, F.M. et al Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. **Folia Microbiologica**. v. 62, n. 139-144, 2017.
- COURA, F.M. et al. Phylogenetic Group Determination of Isolated from Animals Samples. **The Scientific World Journal**, p. 1-4, 2015.
- DE RYCKE, J.; MILON, A.; OSWALD, E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): Two emerging categories of human and animal pathogens. **Veterinary Research**, v. 30, n. 2–3, p. 221–233, 1999.
- ESCOBAR-PÁRAMO, P. et al. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 6, p. 1085–1094, 2004.
- EWING W.H. Edwards and Ewing’s Identification of Enterobacteriaceae. Elsevier Science Publishing, New York, 1986.
- GOPEE, N. V., ADESIYUN, A. A., CAESAR, K. A Longitudinal Study of *Escherichia coli* Strains Isolated From Captive Mammals, Birds, and Reptiles in Trinidad. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 31, n. 3, p. 353–360, 2000.
- GORDON, D. M., COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: Host and geographic effects. **Microbiology**. v. 149, n. 12, p. 3575–86, 2003.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L. et al. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Fourth ed. Iowa, 2010. p. 267–308.

IVES, A.K. et al. Detection of *Salmonella enterica* Serovar Montevideo and Newport in Free-ranging Sea Turtles and Beach Sand in the Caribbean and Persistence in Sand and Seawater Microcosms. 2017. **Zoonoses and Public Health**, v. 64, n. 6, p. 450–459, 2017.

JOHNSON, J. R. et al. Phylogenetic Distribution of Extraintestinal Virulence-Associated Traits in *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 183, n. 1, p. 78–88, 2001. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/317656>>

JOHNSON, J. R.; CLABOTS, C. Sharing of Virulent *Escherichia coli* Clones among Household Members of a Woman with Acute Cystitis. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 43, n. 10, p. e101–e108, 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/508541>>

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L.; DELAVARI, P. Canine Feces as a Reservoir of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 1306–1314, 2001.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 2, p. 123–140, 2004.

MERMIN, J. et al. Reptiles, Amphibians, and Human *Salmonella* Infection: A Population-Based, Case-Control Study. **Clin Infect Dis**. v. 38:3, p. 253–261, 2004.

NATARO, J.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 142–201, 1998.

PEDERSEN, K. et al. Serovars of salmonella from captive reptiles. **Zoonoses Public Health**. v. 56, p. 238–242, 2009.

PITCHER, D.G. et al. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 8, p. 151–156, 1989.

RODAS, C. et al. Development of Multiplex PCR Assays for Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Colonization Factors and Toxins. **Journal of Clinical Microbiology**. 47:4, 1218–1220, 2009

SAMBROOK, J. et al. **Molecular Cloning: A laboratory manual**, 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2100p.

SPANNO, L.C. et al. High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from children and adults in southeastern Brazil. **BMC Infect Dis** v. 17, n. 773, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPATOLOGIA [SBH]. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. **Herpatologia Brasileira**. 7:1, 1-50, 2018.

STARČIČ, M. et al. Haemolytic *Escherichia coli* isolated from dogs with diarrhea have characteristics of both uropathogenic and necrotoxigenic strains. **Veterinary Microbiology**, v. 85, n. 4, p. 361–377, 2002.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 207–217, 2010.

VILA J. et al. A case-control study of diarrhoea in children caused by *Escherichia coli* producing heat-stable enterotoxin (EAST-1), **J. Med. Microbiol.** v. 47, p. 889–891, 1998.

ZHOU Z. et al. An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin 1 (EAST1), **Epidemiol. Infect.** v. 128, p. 363–371, 2002.

WHEELER, E. et al. Carriage of antibiotic-resistant enteric bacteria varies among sites in Galapagos reptiles. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 48, n. 1, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

E. coli é uma espécie bacteriana presente na microbiota intestinal de diversas espécies, cujas dietas podem influenciar na população dos diferentes grupos filogenéticos do agente. No presente estudo, foram observadas diferenças na distribuição e frequência de identificação dos filogrupos em isolados de cães que ingerem alimentos caseiros, sobretudo crus, se comparado a ração, fator que pode ter sido influenciado pela alimentação dos animais. Apesar da menor diversidade, os resultados obtidos com os isolados de répteis também demonstraram que o hábito alimentar dos animais influenciou na frequência de ocorrência de determinados filogrupos, similarmente ao habitat dos animais. Assim, pode-se concluir que fatores como dieta e origem geográfica podem influenciar na frequência e distribuição dos grupos filogenéticos dos isolados de *E. coli*, conforme demonstrado em outros estudos.

Apesar de compor a microbiota indígena do trato intestinal, estirpes de *E. coli* podem oferecer riscos aos seus hospedeiros ao adquirirem diversos fatores de patogenicidade, tornando-se patogênicas a animais e seres humanos. O presente trabalho destaca a maior eliminação de estirpes diarreiogênicas por cães alimentados por dietas caseiras, sobretudo cruas e compostas principalmente por alimentos cárneos *in natura*, prática cada vez mais difundida e de grande adesão por diversos tutores. Adicionalmente, destaca-se a eliminação de potenciais patógenos em amostras de fezes de répteis de diversos habitats, incluindo espécies domiciliadas. Tais achados sugerem, portanto, o papel desses grupos animais como possíveis reservatórios de *E. coli* patogênica. Assim, o presente estudo reforça a necessidade de maiores cuidados na manipulação desses animais e a adoção de medidas que visem menor exposição dos cães a potenciais fontes de contaminação por *E. coli*, de maneira a reduzir a contaminação do ambiente e o contato dos agentes com outros animais e com os seres humanos.

4. ANEXOS

4.1 TABELAS

Tabela 4.1 Relação de genes pesquisados, sequência dos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR quadruplex e monoplex para identificação dos grupos filogenéticos de *E. coli*

Reação	Iniciador	Sequencia dos iniciadores (5' → 3')	Temperatura anelamento	Produto (pb)
Quadruplex	chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	59°C	288
	chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
	yjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTCCAGGAG		211
	yjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG		
	TspE4C2.1b	CACTATTCGTAAGGTCATCC		152
	TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC		
	AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC		400
ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA			
Grupo E	ArpAgpE.f	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	57°C	301
	ArpAgpE.r	GAAAAGAAAAAGAATCCCAAGAG		
Grupo C	trpAgpC.1	AGTTTTATGCCAGTGCAG	59°C	219
	trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTACGCCC		

Tabela 4.2 Relação de fatores de patogenicidade, sequência dos iniciadores, tamanho dos fragmentos amplificados e referência bibliográfica das diferentes reações de PCR executadas.

Fator	Patotipo	Sequencia dos iniciadores (5' → 3')	Produto (bp)	Referências
K99	ETEC	TATTATCTTAGGTGGTATGG	314	FRANCK et al., 1998
		GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTC		
F41	ETEC	GCATCAGCGGCAGTATCT	380	
		GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT		
STaP	ETEC	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTCTGTA	190	
		AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTA A		
Intimina	EPEC	ATATCCGTTTTAATGGCTATCT	425	
	EHEC	AATCTTCTGCGTACTGTGTCA		
Stx1	STEC	TTCGCTCTGCAATAGGTA	555	
	EHEC	TTCCCCAGTTCAATGTAAGAT		
Stx2	STEC	GTGCCTGTTACTGGGTTTTCTTC	118	
	EHEC	AGGGGTCGATATCTCTGTCC		

Fator	Patotipo	Sequencia dos iniciadores (5' → 3')	Produto (bp)	Referências
K88	ETEC	GTATCTGTCCGAGAATATCA GTTGGTACAGGTCTTAATGG	499	
F18	ETEC	TGGTAACGTATCAGCAACTA ACTTACAGTGCTATTCGACG	313	
987p	ETEC	GTA ACTCCACCGTTTGTATC AAGTTACTGCCAGTCTATGC	409	MACÊDO et al., 2007
STb	ETEC	TGCCTATGCATCTACACAAT CTCCAGCAGTACCATCTCTA	113	
LT	ETEC	GGCGTTACTATCCTCTCTAT TGGTCTCGGT CAGATATGT	272	
Iha	STEC EHEC	CAGTTCAGTTTCGCATTCACC GTATGGCTCTGATGCGATG	1305	
Efa1	STEC EHEC	GAGACTGCCAGAGAAAG GGTATTGTTGCATGTTCAG	479	TATARCZAK et al., 2005
ToxB	STEC EHEC	ATACCTACCTGCTCTGGATTGA TTCTTACCTGATCTGATGCAGC	602	
EhxA	STEC EHEC	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG TCTCGCCTGATAGTGTGGTA	1551	SCHMIDT et al. 1995
Saa	STEC	CGTGATGAACAGGCTATTGC ATGGACATGCCTGTGGCAAC	119	JENKINS et al., 2003
BFP	EPEC	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTATCCAACCTGGTA	326	GUNZBURG et al., 1995
CNF-1	NTEC	GA ACTTATTAAGGATAGT CATTATTTATAACGCTG	543	BLANCO et al., 1996
CNF-2	NTEC	AATCTAATTAAGAGAAC CATGCTTTGTATATCTA	543	
F17	NTEC	GCAGAAAATTCAATTTATCCTTGG CTGATAAGCGATGGTGAATTAAC	537	BERTIN et al., 1996
AggR	EAEC	CAGAATACATCAGTACACTG GAAGCTTACAGCCGATATAT	433	
AAF-II	EAEC	TGCGATTGCTACTTTATTAT ATTGACCGTGATTGGCTTCC	242	TOKUDA et al., 2010
Pet	EAEC	ACTGGCGGACTCATTGCTGT GCGTTTTTCCGTTCCCTATT	832	
EAST-1	EAEC ETEC EPEC	CCATCAACACAGTATATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	111	YAMAMOTO; NAKAZAWA, 1997

Fator	Patotipo	Sequencia dos iniciadores (5' → 3')	Produto (bp)	Referências
IpaH	EIEC	G TTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	600	ARANDA et al., 2007
AIDA-I	DAEC	TGCAAACATTAAGGGCTCG CCGGAACATTGACCATAACC	450	NIEWERTH et al., 2001

Tabela 4.3. Sequência dos iniciadores e tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR multiplex para identificação de fatores de patogenicidade de ETEC em humanos

Fator	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Produto (bp)
Sth	TTCACTTTCCCTCAGGATG CTATTCATGCTTTCAGGACCA	120
CFA-I	GCTTATTCTCCCGCATCAA ACTTGTCTCCCATGACAC	170
CS1	TCCGTTCCGGCTAAGTCAGTT CCGCACATTTCTGTGTTCT	243
CS4	ACCTGCGGCAAGTCGTTT TCTGCAGGTTCAAAGTCACA	198
CS7	CGCCGGTTACACGTAGTGAT CCATTTAAAGTGATTGCGACTT	154
CS12	CCAGTCTATGCCAGGTTGCT TGTGGGGTCCACAGTTTACCA	137
CS3	CTAGCTTTGCCACCACCATT GGCAACTGACTCCCATTTGT	100
CS21	TCATGAGCCTGCTGGAAGTTATCA TCCGGCTACCTAAAGTAATTGAGT	617
CS2	AGTGGTGGCAGCGAAACTAT TTCTCTGTGGGTTCTCAGG	368
CS5	TCCGCTCCCGTTACTCAG GAAAAGCGTTCACACTGTTTATATT	226
CS17	GGAGACGCTGAATACAAGTGA CTCAGGCGCAGTTCCTTGT	130
CS17/19	CGGTGCGTTTAACACAGCTA TCGATACTCGCATTCGTT	195
CS8	ATCCGGATTATCAAGCTCCA GAAGATGTTATTGCACCACCAA	166
CS6	CTGTGAATCCAGTTTCGGGT CAGGAACTTCCGGAGTGGTA	152

Fator	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Produto (bp)
CS15	CGAAATTGGACAAGCGATG TCCAGCAGGGATATTATTCG	130
CS20	AGGTATCCAAATCCGCACTG CATCAGCCAGCACATAGGAA	114
CS18	ATCCGTCAGGTGTTTGTGGT CACCTGAATTCCTCGACAGG	362
CS13	GGGACTGCCACAATGAATTT CAGCACCACCTGCTGATTTA	178
CS14	TTTGCAACCGACATCTACCA CCGGATGTAGTTGCTCCAAT	162
CS22	ATTGGACAAGCGTCCAACAC TTCCAGCAGGGATATTATCATTTT	127