



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JUAN JOSUE PUÑO SARMIENTO

**PESQUISA DE AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI*
DIARREIOGÊNICAS EM CÃES E GATOS COMO POSSÍVEIS
FONTES DE INFECÇÃO HUMANA**

Londrina
2013

JUAN JOSUE PUÑO SARMIENTO

**PESQUISA DE AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI*
DIARREIOGÊNICAS EM CÃES E GATOS COMO POSSÍVEIS
FONTES DE INFECÇÃO HUMANA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P984p Puño Sarmiento, Juan Josue.

Pesquisa de amostras de *Escherichia coli* diarreio gênicas em cães e gatos como possíveis fontes de infecção humana / Juan Josue Puño Sarmiento. – Londrina, 2013.
57 f. : il.

Orientador: Gerson Nakazato.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2013. Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli* – Teses. 2. Enterobacterias – Teses. 3. Genética bacteriana – Teses. 4. Virulência (Microbiologia) – Teses. 5. Diarreia em animais – Teses. 6. Microbiologia veterinária – Teses. I. Nakazato, Gerson. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título

CDU 579.842

JUAN JOSUE PUÑO SARMIENTO

**PESQUISA DE AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI*
DIARREIOGÊNICAS EM CÃES E GATOS COMO POSSÍVEIS FONTES
DE INFECÇÃO HUMANA**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Gerson Nakazato
UEL – Londrina - PR

Londrina, 17 de Maio de 2013.

Aos meus pais, Juan e Doris pelo constante incentivo na minha realização profissional e pessoal, por sempre apoiarem as minhas decisões, pelo grande amor que me demonstram a cada dia, e pelo sacrifício que propiciou a conclusão desta etapa da minha vida. À minha irmã Kelyn, pelo carinho, fé, amizade, sacrifício, por ser essa pessoa tão maravilhosa, e por quem eu me esforço cada dia mais para alcançar os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter permitido a realização deste sonho, por ter me cuidado em todo momento e por ter me dado sustento para nunca desistir.

Agradecimento especial ao meu orientador, Professor Dr. Gerson Nakazato, por ter apostado e acreditado em mim, pelo conhecimento transmitido ao longo deste tempo, que despertou em mim uma verdadeira admiração pela vida acadêmica, por sua paciência, dedicação, amizade e pelos vários conselhos que foram importantes no meu crescimento como pessoa.

À professora Dra. Renata Kobayashi, pelo ajuda e apoio incondicional na realização desta tese. Agradeço pelas horas dedicadas à minha formação acadêmica, pelo carinho, amizade, confiança e por ser um exemplo de ser humano.

Ao professor Dr. Luciano Panagio pela sua amizade e por ter aceitado ser parte da minha banca examinadora.

Ao professor Dr. Sergio Rocha por ter participado da minha qualificação e ser parte da banca definitiva, além disso, por toda a ajuda prestada durante a realização do presente trabalho.

À professora Dra. Jacinta S. Pelayo, pela contribuição e auxílio na elaboração do trabalho, por ter viabilizado o envio das amostras para a sua sorotipagem.

Ao professor Dr. Marcelo Zanutto e sua aluna Carolina, pela dedicação e integral participação na realização deste projeto e pelas valiosas sugestões.

Ao professor Dr. Ricardo Almeida e à Jussevania Pereira Santos, por ter fornecido as células HEp-2 e HeLa, importantes na realização dos testes de adesão.

Aos professores do Mestrado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, pelos valiosos conhecimentos transmitidos, pela paciência e por terem contribuído na minha excelente formação acadêmica.

Ao meu amigo Leonardo Medeiros, por ter ajudado no decorrer do projeto, pela disposição imediata na realização dos testes, pela amizade e pela companhia durante este tempo no laboratório.

À minha grande amiga Viviane Cardozo, por ter me ajudado em todo momento desta minha estadia no Brasil, pela sua colaboração no laboratório, pelo apoio, confiança e, sobretudo a sua amizade.

Às colegas e amigas Paula Signolfi Cyoia, Giovana Bodnar e Sara Scandorieiro por serem essas pessoas maravilhosas; as suas amizades e grande carinho fizeram que o laboratório fosse uma casa.

Agradeço a todos os meus amigos e colegas do laboratório NIP3: Mariane, Gabriela, Marcelly, Vitória, Carina, Vanessa, Angela, Jéssica, Marcela, Erick, Luis, Edevi e Osvaldo, pelo companheirismo, paciência e amizade. Estes anos de mestrado teriam sido menos prazerosos se eu não contasse com vocês.

À minha amiga Eliane Saori, pela sua amizade e por sua ajuda que facilitou a redação deste trabalho.

À minha tia Cesilia Sarmiento, pelo carinho, ajuda incondicional e por sempre acreditar em mim.

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro para viabilizar a realização deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, sem a qual não teria sido possível a minha dedicação total ao presente trabalho.

E por último agradeço ao Brasil, e em especial à cidade de Londrina por me acolher e me dar à oportunidade de ter esta experiência. Não tem sido fácil ficar longe da minha família, mas o povo londrinense faz com que eu não me sinta um estranho.

Muito obrigado!!!

PUÑO-SARMIENTO, Juan Josue. **Pesquisa de amostras de *Escherichia coli* diarreio gênica em cães e gatos como possíveis fontes de infecção humana.** 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2013.

RESUMO

Escherichia coli faz parte da microbiota intestinal e pode causar doenças em alguns humanos e outros animais, incluindo cães e gatos, os quais são considerados como animais de estimação. As linhagens de *E. coli* diarreio gênica (DEC) são classificadas em seis categorias: enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), produtora de Shiga-toxina (STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), e as que aderem difusamente (DAEC). Neste estudo, foram isoladas 144 e 163 colônias de *E. coli* de amostras fecais de 50 cães e 50 gatos, respectivamente, com e sem diarreia, de um Hospital Veterinário (isolados clínicos). Os fatores de virulência foram determinados utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase - Multiplex. Para os isolados de DEC foram realizados ensaios de aderência em células HEP-2 e HeLa, resistência aos antimicrobianos e a sorotipagem (antígeno somático e flagelar). Foram encontradas 25 (17.4%) e 4 (2.5%) cepas de DEC isoladas de cães e gatos, respectivamente. Somente os patótipos de EPEC e EAEC foram encontrados em ambos os animais. Entretanto, os genes dos outros patótipos (STEC, EIEC e ETEC) não foram encontrados nestes isolados clínicos. A capacidade de aderência em cultura de células foi avaliada. Todas as cepas diarreio gênicas mostraram aderência manose-resistentes para células HEP-2 e HeLa, e a aderência agregativa foi predominante nestes isolados. Cepas multiresistentes aos antimicrobianos foram encontradas na maioria das cepas diarreio gênicas incluindo os antimicrobianos usuais e não usuais na prática veterinária. Os sorótipos destes isolados de DEC foram variáveis. O sorótipo ONT foi o mais identificado nestes isolados. Alguns sorótipos encontrados neste estudo foram descritos em DEC humanas. Neste estudo, nós demonstramos que animais de estimação podem carregar genes de virulência de DEC, principalmente cepas de EPEC e EAEC. A presença destes fatores de virulência em isolados de animais sem diarreia sugerem que estes animais de estimação podem atuar como reservatórios para infecções humanas.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Cães. Gatos. Diarreia. Zoonose.

PUÑO-SARMIENTO, Juan Josue. **Pesquisa de amostras de *Escherichia coli* diarreio gênica em cães e gatos como possíveis fontes de infecção humana.** 2013. 57 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2013.

ABSTRACT

Escherichia coli are gut microbiota bacteria that can cause disease in some humans and other animals, including dogs and cats that humans often keep as pets. *E. coli* diarrheagenic (DEC) strains are classified into six categories: enteropathogenic (EPEC), enterotoxigenic (ETEC), Shiga toxin-producing (STEC), enteroinvasive (EIEC), enteroaggregative (EAEC), and diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC). In this study 144 and 163 *E. coli* colonies were isolated from the fecal samples of 50 dogs and 50 cats, respectively, with and without diarrhea from a Veterinary Hospital (clinical isolates). The virulence factors were determined using multiplex Polymerase Chain Reaction. Only for DEC strains were performed adherence to HEp-2 and HeLa cells assays, antimicrobial resistance and serotype (somatic or flagellar antigens). We found 25 (17.4%) and 4 (2.5%) *E. coli* diarrheagenic strains isolated from dogs and cats, respectively. Only the EPEC and EAEC pathotypes were found in both animals. Meanwhile, genes from other pathotypes (STEC, EIEC, and ETEC) were not found in these clinical isolates. The adherence capacity of cells in culture was examined. All of the diarrheagenic strains showed mannose-resistant adherence to HEp-2 and HeLa cells, and aggregative adherence was predominant in these isolates. Multiresistant strains to antimicrobials were found in most diarrheagenic strains including usual and unusual antimicrobials in veterinary practices. The serotypes of these DEC isolates were variable. The strain ONT serogroup was predominant in these isolates. Some serotypes found in our study were described to human DEC. Here, we demonstrated that pets carry virulent DEC genes, which are mainly strains of EPECs and EAECs. The presence of these virulence factors in isolates from animals without diarrhea suggests that pets can act as a reservoir for human infections.

Keywords: *Escherichia coli*. Dogs. Cats. Diarrhea. Zoonosis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1.	ESCHERICHIA COLI.....	10
1.2.	FATORES DE VIRULÊNCIA	11
1.3.	ESCHERICHIA COLI DIARREIOGÊNICA (DEC)	13
1.3.1.	Escherichia Coli Enteropatogênica (EPEC).....	14
1.3.2.	Escherichia Coli Produtora Da Shiga-Toxina (STEC).....	17
1.3.3.	Escherichia Coli Enteroagregativa (EAEC).....	19
1.3.4.	Escherichia Coli Enterotoxigênica (ETEC).....	21
1.3.5.	Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC)	22
1.4.	DEC EM CÃES E GATOS.....	23
2	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral.....	35
3.2.	Objetivos Específicos	35
4.	ARTIGO CIENTÍFICO	36
4.1	Detection of Diarreagenic Escherichia coli strains isolated from dogs and cats in Brazil	36
5.	CONCLUSÕES	55
ANEXO	56
ANEXO A - Comissão de ética no uso de animais	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli foi descrito pela primeira vez em 1885, pelo pediatra alemão Theodore Von Escherich, que o denominou, inicialmente, de *Bacterium coli commune* (ESCHERICH, 1885). Em 1919, após uma revisão da nomenclatura, foi renomeada para *Escherichia coli*, fazendo referência ao seu descobridor.

É um bacilo Gram negativo, representante importante da família Enterobacteriaceae, não esporulado, oxidase negativo, pode ou não apresentar motilidade. Fontes de carbono como acetato e glicose são usados para o crescimento, porém o citrato não pode ser utilizado. Produzem ácidos a partir da glicose, sendo o ácido fórmico hidrolisado a hidrogênio e dióxido de carbono. Acetoína ou acetil metil carbinol não são formados, revelando negativo para a prova de Voges-Proskauer (VP). Não produzem sulfeto de hidrogênio, mas produzem indol a partir do triptofano (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). *E. coli* faz parte das bactérias anaeróbias facultativas, que colonizam o trato intestinal de humanos e animais de sangue quente (DRASAR; HILL, 1974).

E. coli, componente da microbiota normal intestinal (ROBINS-BROWNE, 1987), é um dos principais agentes de infecções intestinais em humanos (GILES; SANGSTER, 1948; LEVINE, 1987; SMITH, 1949) e outros animais como bovinos, porcos e coelhos (BLANCO et al., 1993; CASTRO et al., 1984; ROBINS-BROWNE et al., 1994).

Além disso, algumas linhagens de *E. coli* estão associadas a infecções extraintestinais em diferentes hospedeiros. Em humanos, são responsáveis por importantes patologias como septicemia (ORSKOV; ORSKOV, 1985), infecções do trato urinário (ITU) (PECHERE, 1985) e até meningite neonatal (OVERALL JR., 1970), e elas vêm causando grandes prejuízos em diversas áreas da saúde. Em cães e gatos podem causar ITU (PEETERS, 1994; WOOLEY; BLUE, 1976) e piometra em cães (BJURSTROM, 1993).

As amostras de *E. coli* associadas a infecções extraintestinais são conhecidas por ExPEC (RUSSO; JOHNSON, 2000), enquanto as amostras associadas às infecções intestinais, tanto em humanos como em outros animais, são conhecidas como *E. coli* diarreio gênicas (DEC) (NATARO; KAPER, 1998).

De modo geral, a evolução fez com que algumas cepas de *E. coli* adquirissem fatores de virulência através da transferência horizontal de genes. Por isso, a capacidade de *E. coli* de causar um amplo espectro de doenças em humanos vem aumentando nos últimos anos (NATARO; KAPER, 1998).

Em 1947 Kauffmann propôs, pela primeira vez, que linhagens de *E. coli* fossem identificadas tendo-se como base seus principais antígenos de superfície. Dividindo esta espécie em sorogrupos baseados na composição do antígeno somático O, estável ao calor, relacionados com polissacarídeos da membrana externa. Em sorotipos, que são caracterizados pela composição do antígeno flagelar H, termo-lábil, e antígenos capsulares K termoestáveis, relacionados com polissacarídeos capsulares. Caracterizando-se, portanto, a linhagem em O:H ou O:K:H (BLANCO et al., 1994).

Foram descritos, até o momento mais de 180 antígenos O, 60 H e 100 K diferentes, possibilitando inúmeras combinações (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004).

1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

Existem diversos fatores de virulência encontrados em linhagens de DEC, como as adesinas (fimbriais e afimbriais), invasinas, toxinas, sistemas de captação de ferro (aerobactinas), ilhas de patogenicidade, resistência aos diversos antimicrobianos (multiresistência) e outros fatores. A presença ou ausência de determinados fatores de patogenicidade tem sido muito importante em estudos envolvendo principalmente a epidemiologia da doença. Inclusive técnicas moleculares foram bastante utilizadas na epidemiologia molecular bacteriana (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991).

A colonização das enterobactérias em determinados tecidos do hospedeiro ocorre através de adesinas bacterianas, que podem ser mediadas por estruturas de superfícies denominadas fímbrias ou por proteínas afímbriais. O processo de adesão é importantíssimo nas etapas iniciais da infecção (KLEMM; SCHEMBRI, 2000).

Algumas linhagens de *E. coli* possuem capacidade de invadirem tecidos causando bacteremia, meningites e outras patologias graves. Esse processo de invasão geralmente é mediado por proteínas conhecidas como invasinas produzidas por esses agentes (NIEMANN; SCHUBERT; HEINZ, 2004). Outros fatores ainda desconhecidos também podem estar envolvidos nesses processos invasivos.

As cápsulas ou antígenos K, que são estruturas compostas por substâncias poliméricas extracelulares, podem apresentar funções relacionadas a patogenicidade, como atividade antifagocitária, adesão e resistência a antimicrobianos (JANN; JANN, 1977).

Algumas linhagens de *E. coli* produzem exotoxinas (enterotoxinas e shiga-toxinas) causando quadros de intoxicação alimentar. As endotoxinas, por sua vez, também podem ser consideradas fatores de virulência, pois são substâncias responsáveis por várias manifestações que acompanham as infecções intestinais e extraintestinais (SEARS; KAPER, 1996).

Recentemente, foram descobertas regiões do DNA compostas por cassetes de genes de virulência que, dependendo do tamanho, podem ser transferidas de uma bactéria para outra conferindo-lhe a capacidade de causar doenças. Essas regiões foram denominadas “ilhas de patogenicidade” (HACKER; KAPER, 2000).

A determinação de possíveis fontes de infecção é importante na prevenção e controle de infecções bacterianas, como as de origem intestinais.

1.3 DEC

As amostras de *E. coli* associadas à infecção intestinal, tanto em crianças, adultos e outras espécies, são conhecidas como DEC e são classificadas em seis patótipos ou categorias, baseado nos seus marcadores de virulência específicos, manifestações clínicas e a sua interação com células epiteliais cultivadas *in vitro* (BEUTIN, 1999; NATARO; KAPER, 1998). Esses patótipos são:

- a. *E. coli* enteropatogênica (EPEC), expressando fatores de colonização, tais como a intimina (codificada pelo gene *eae*) e “*bundle forming pill*” (BFP);
- b. *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), caracterizadas por produzirem toxinas termo-lábeis (LT) e termo-estáveis (ST) e diferentes antígenos de colonização hospedeiro específicos;
- c. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), caracterizadas por se comportarem como *Shigella*, não somente na patogênese, com invasão e multiplicação da bactéria nos enterócitos, mas também no comportamento bioquímico (incapacidade de descarboxilar a lisina e a ausência de flagelo);
- d. *E. coli* enteroagregativa (EAEC), mostrando um padrão de adesão do tipo agregativa as células HEp-2 e HeLa;
- e. *E. coli* produtora de Shiga-Toxinas (STEC), expressando um ou mais tipos distintos de citotoxinas (Stx1 e Stx2).
- f. *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC); ainda hoje esta categoria não é muito definida.

A patogênese das infecções intestinais causada por DEC varia entre um patótipo e outro. Cada uma apresenta mecanismos de virulência específicos, causam manifestações clínicas distintas, apresentam aspectos epidemiológicos diferentes, pertencem aos sorotipos O:H definidos, além de apresentarem tipos específicos de interação com células epiteliais *in vitro* (NATARO; KAPER, 1998).

Embora essa classificação continue sendo amplamente empregada, tem sido demonstrado que algumas categorias incluem microrganismos distintos. Desta forma, as amostras de EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas

e algumas linhagens de STEC são classificadas como *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

1.3.1 EPEC

EPEC apareceu na década de 40 como uma epidemia de gastroenterite infantil aguda em uma creche, produzindo-se um índice de mortalidade da ordem de 50%. As linhagens de EPEC infectaram populações humanas através do mundo e permanecem ainda como uma das causas primárias de diarreia infantil em países em desenvolvimento (ALBERT et al., 1995; TORRES et al., 2001). No Brasil, por exemplo, são responsáveis por mais de 30% dos casos de diarreia em crianças de baixo status sócio econômico. (SOUZA et al., 2002).

O termo *E. coli* enteropatogênica foi criado em 1955 por Erwin Neter para designar um grupo de cepas de *E. coli* associados a diarreia infantil e diferenciá-las das cepas comensais ou das que causam infecções extra-intestinais (NETER et al., 1955). Mas o potencial patogênico da EPEC só foi confirmado e amplamente aceito anos depois, após estudos realizados com voluntários onde eles ingeriram o microrganismo confirmando-se os sintomas evidentes de diarreia (LEVINE et al., 1978).

A diarreia provocada por EPEC é, clinicamente, mais grave do que aquelas provocadas por outros patógenos, acompanhado de dores abdominais, vômitos e febre, com duração de seis horas a três dias, período de incubação entre 17 a 72 horas (FRANCO; LANDGRAF, 1996; SENERWA et al., 1989).

O principal mecanismo de patogenicidade de EPEC se caracteriza por uma lesão histopatológica no epitélio intestinal denominada “*Attaching and Effacing*” (A/E), por tanto este mecanismo inicia-se com a adesão íntima da bactéria à membrana apical do enterócito, levando à destruição das microvilosidades intestinais e resultando na formação de estruturas semelhantes a pedestais, este fenômeno ocorre pela polimerização da actina e proteínas do citoesqueleto da célula hospedeira (MOON et al., 1983; TRABULSI; KELLER; TARDELLI GOMES, 2002).

Os genes necessários para o estabelecimento da lesão A/E estão localizados em uma ilha de patogenicidade cromossomal de 35 kb, denominada *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE) (MCDANIEL et al., 1995). A região LEE é constituída por 41 *Open Reading Frames* (ORF) organizadas em cinco operons, que são: LEE1, LEE2, LEE3, LEE5 e LEE4 (DEAN; MARESCA; KENNY, 2005).

Os três primeiros operons contêm os genes que codificam o sistema de secreção do tipo III (SST3), e o gene regulador *ler*, cuja função é regular positivamente os genes dentro e fora de LEE (ELLIOTT et al., 2000; GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005; MELLIES et al., 1999). LEE4 contêm os genes que codificam as proteína *EPEC secreted proteins* (EspA, EspD, EspB, EspF) as quais são secretadas pelo SST3 (NEVES et al., 2003; SEKIYA et al., 2001). LEE5 contêm os genes *eae*, *tir* e *cesT*, os quais codificam, respectivamente, a adesina afimbrial intimina, o seu receptor Tir (*translocated intimin receptor*) e a chaperonina CesT das proteínas Tir e Map (*mitochondrial-associated protein*) (SANCHEZ-SANMARTIN et al., 2001).

A intimina, é uma proteína de membrana externa de 94 kDa codificada pelo gene *eae*, que é responsável pela aderência íntima da bactéria à célula do hospedeiro (JERSE et al., 1990). A intimina apresenta duas regiões funcionais, carboxi- e amino-terminais. A porção N-terminal, inserida na membrana externa da bactéria, é extremamente conservada entre diferentes amostras (TOUZE et al., 2004). A porção C-terminal, especificamente os últimos 280 resíduos de aminoácidos, corresponde ao domínio que interage com Tir e é considerada variável, definindo os diferentes subtipos de intimina, que são designadas por letras do alfabeto grego (ADU-BOBIE et al., 1998). Cada um deles pode estar relacionado com o tropismo tecidual da bactéria para diferentes regiões do intestino (PHILLIPS; FRANKEL, 2000).

O receptor da intimina é a proteína Tir, sintetizada e translocada pela própria bactéria para a célula epitelial (KENNY et al., 1997). É uma proteína integral de membrana de 90 kDa, após ser translocada, Tir é fosforilada e se insere na membrana da célula hospedeira. Tir apresenta uma estrutura em grampo, onde as porções carboxi- e amino-terminais localizam-se dentro da célula hospedeira e

interagem com proteínas do citoesqueleto, e a alça extracelular funciona como domínio de ligação para a Intimina. Essa interação leva a formação dos pedestais na célula hospedeira (CAMPELLONE; LEONG, 2003; DE GRADO et al., 1999; GOOSNEY; DEVINNEY; FINLAY, 2001; HARTLAND et al., 1999).

Em 1995, na cidade de São Paulo, Brasil, realizou-se o segundo Simpósio Internacional de *E. coli*. Nesta ocasião, as amostras de EPEC foram divididas em EPEC típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC). As duas subcategorias se diferenciam na presença ou ausência do plasmídeo EAF (*EPEC factor adherence*), respectivamente (KAPER, 1996). O plasmídeo EAF contém os genes envolvidos com a expressão de uma adesina fimbrial denominada *bundle-forming pilus* (BFP), além do operon *per* (*plasmid encoded regulator*), o qual codifica genes reguladores de fatores de virulência de EPEC (TRABULSI et al., 2002). O plasmídeo EAF não é essencial para a formação de lesões A/E, embora sua presença aumente a eficiência do processo.

O operon *bfp*, constituído por 14 genes, codifica a expressão do BFP, fimbria do tipo IV, organizada na forma de feixes. BFP é responsável pela adesão localizada da bactéria na célula hospedeira no primeiro estágio da lesão A/E (GIRON; HO; SCHOOLNIK, 1991; STONE et al., 1996). Foi relatada a presença de esta fimbria em amostras de origem canina, o que sugere proximidade com as amostras de tEPEC humanas (ALMEIDA, 2005).

Por muitos anos, o mecanismo pelo qual EPEC causava diarreia era desconhecido, e este patotipo só era identificado com base no sorotipo O:H. Em 1987, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu os seguintes sorogrupos clássicos de EPEC: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1987). Hoje se sabe que esses sorogrupos podem pertencer a outras categorias de DEC como, por exemplo, EAEC e EHEC (TRABULSI et al., 2002).

Os sorogrupos clássicos de EPEC pertencem principalmente tEPEC, por outro lado, amostras de aEPEC apresenta uma grande diversidade de sorotipos, a maioria não pertencentes aos sorogrupos clássicos ou são não tipáveis (CAMPOS

et al., 1994; DO VALLE et al., 1997; RODRIGUES et al., 1996; SCOTLAND et al., 1996).

Os principais sorotipos que representam tEPEC são O55:H6, O86:H34, O111:H2, O114:H2, O119:H6, O127:H6, O142:H6 e O142:H34, e no caso das amostras de aEPEC são O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111ac:H8, O111:H9, O111:H25, O119:H2, O125ac:H6, O128:H2 (TRABULSI et al., 2002). Esses dados foram recolhidos de pesquisas feitas em diferentes lugares como Itália (GIAMMANCO et al., 1996), Reino Unido (SCOTLAND et al., 1996), Rio de Janeiro (ROSA et al., 1998) e São Paulo (CAMPOS et al., 1994; DO VALLE et al., 1997; RODRIGUES et al., 1996).

Na presença de células epiteliais, as amostras de tEPEC determinam um padrão de adesão localizada (LA) (SCALETSKY; SILVA; TRABULSI, 1984), enquanto as aEPEC podem apresentar padrão de aderência localizada-*like* (LAL), adesão localizada (LA), adesão agregativa (AA), adesão difusa (DA), não definidos (UND) e amostras sem adesão (NA) (SCALETSKY et al., 1996).

Cepas de tEPEC são encontradas principalmente nos seres humanos como reservatório, são raramente isolados de animais, ao contrario de cepas de aEPEC que tem sido isoladas de humanos e de diferentes espécies de animais (NATARO; KAPER, 1998; ROTTNER; STRADAL; WEHLAND, 2005).

1.3.2 STEC

As cepas de STEC merecem relevância como bactérias que podem causar desde uma diarreia branda até severas diarréias sanguinolentas (colites hemorrágicas - HC), que podem evoluir para complicações intestinais como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) e a Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT) (EKLUND; LEINO; SIITONEN, 2002; GRIFFIN; TAUXE, 1991; NATARO; KAPER, 1998).

O reconhecimento de STEC como uma classe patogênica foi o resultado de duas linhas de estudo: a primeira foi pela capacidade de algumas cepas de *E. coli*, pertencentes aos sorogrupos O18, O26, O111, O126 e O128, de

produzirem toxinas, referida como Verotoxina (VT), que induzia um efeito citotóxico distinto em células Vero (células de rim de macaco verde africano) (KONOWALCHUK; SPEIRS; STAVRIC, 1977). Em 1982, foi identificada uma toxina de *E. coli* que apresentava similaridades com a toxina de *Shigella dysenteriae*, porque esta inibia a síntese protéica em células de adenocarcinoma de colo uterino humano (células HeLa), foi chamada toxina Shiga-like toxin (SLT) (O'BRIEN, A. D. *et al.*, 1982).

A segunda linha de estudo, foi em 1983 quando começaram a aparecer surtos de HC nos Estados Unidos por um raro sorotipo de *E. coli*, O157:H7, associado a ingestão de hambúrguer mal cozido. As amostras de *E. coli* isoladas revelaram a presença de SLT, confirmando que a citotoxina Vero e SLT eram a mesma toxina (O'BRIEN, A. O. *et al.*, 1983). Em 1996, a adoção da nomenclatura *E. coli* produtora de Shiga-toxina passou a ser empregada, embora grupos distintos de pesquisadores ainda designem esta citotoxina como VT (CALDERWOOD *et al.*, 1996).

Mais de 200 sorotipos de *E. coli* apresentam a capacidade de produzir Stx, entretanto o sorotipo O157:H7 é considerado o mais importante (NATARO; KAPER, 1998). Devido à associação de O157:H7 com surtos de HC ocorrido maiormente no Japão (LICENCE *et al.*, 2001; MICHINO *et al.*, 1999; RILEY *et al.*, 1983) as cepas pertencentes a este sorotipo foram denominadas *E. coli* enterohemorrágicas. Por tanto, EHEC passou a ser um subgrupo de STEC (JOHNSON; LIOR; BEZANSON, 1983; LEVINE, 1987; WHIPP; RASMUSSEN; CRAY, 1994).

EHEC é um patógeno intestinal que pode causar doença com apenas 10 unidades formadoras de colônia (UFC). Crianças, menores de 10 anos e idosos constituem os principais grupos de risco que podem desenvolver SHU (GRIFFIN; TAUXE, 1991).

Cepas de *E. coli* O157:H7 são responsáveis por causar aproximadamente 73 mil casos de doença e mortes por ano nos Estados Unidos (GANSHEROFF; O'BRIEN, 2000).

O mecanismo de patogenicidade de STEC ocorre primeiro, pela sobrevivência no ambiente ácido do estômago, adesão na mucosa do cólon e posterior colonização e pela produção de Stx. Por isso, o número de UFC necessárias para causar infecção é relativamente pequeno, aproximadamente entre 100 a 200 (SCHMIDT *et al.*, 1993).

STEC são capazes de elaborar duas potentes citotoxinas denominadas Stx1 e Stx2, codificadas pelos genes *stx1* e *stx2* respectivamente, inseridos em fagos lambda que se integram ao cromossomo bacteriano. Algumas cepas de STEC produzem somente uma das citotoxinas, enquanto outras produzem ambas as toxinas (BERTIN *et al.*, 2001; SCHMIDT *et al.*, 1993).

A estrutura da Stx consiste de duas subunidades A e B, representada pelo modelo 1A:5B. A subunidade A de aproximadamente 32 kDa, é composta de duas subunidades, A1 (fração ativa da toxina) e A2 (liga as subunidades A e B). A subunidade B formada por um conjunto de 5 frações idênticas, responsáveis pela ligação da toxina à célula eucariótica pelo receptor glicolipídico Gb3 (JACEWICZ *et al.*, 1986; MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1996; TESH; O'BRIEN, 1991).

As cepas de EHEC, além da produção de Stx expressam proteínas dos genes da região LEE como a intimina causando a lesão histopatológica A/E, descrita anteriormente em EPEC. A intimina é um fator importante na colonização para EHEC em animais como bovinos, ovinos, caprinos e suínos (MAINIL; DAUBE, 2005). No entanto, mutantes intimina-negativos ainda são capazes de colonizar certos locais do trato gastrointestinal, indicando que outros fatores de colonização podem estar presentes.

1.3.3 EAEC

EAEC é um patotipo de *E. coli* diarreiogênica que tem a capacidade de aderir a células epiteliais HEp-2 *in vitro* com um padrão denominado agregativo (NATARO *et al.*, 1987; VIAL *et al.*, 1988). Recentemente foi reconhecido como um grupo de importância por estar associado a casos de diarreia aquosa e

frequentemente persistente em países em desenvolvimento e desenvolvidos (HARRINGTON *et al.*, 2006; KAPER, *et al.*, 2004; WEINTRAUB, 2007).

As primeiras amostras estabelecidas como adesão agregativa (AA) foram isoladas em um estudo epidemiológico envolvendo crianças com diarreia no Chile (NATARO *et al.*, 1987). A importância desta classe em Saúde Pública está aumentando e ganhando reconhecimento, porque pode afetar tanto crianças quanto adultos (HUANG *et al.*, 2004; ITOH *et al.*, 1997; JIANG *et al.*, 2002).

Foram realizados vários estudos tentando relacionar à diarreia aguda com EAEC em países em desenvolvimento. Alguns deles encontraram essa associação (BOUZARI *et al.*, 1994; GONZALEZ *et al.*, 1997; NATARO *et al.*, 1987; PAUL *et al.*, 1994), mas em outros não apareceu essa relação (BHATNAGAR *et al.*, 1993; CRAVIOTO *et al.*, 1991; GOMES *et al.*, 1998), esta diferença pode ser dada pelas distintas faixas etárias estudadas ou os métodos de detecção de EAEC. Por exemplo, nos Estados Unidos, é um dos patógenos mais comumente encontrados em casos de diarreia (FLORES; OKHUUSEN, 2009).

EAEC apresenta uma diarreia persistente maior ou igual aos 14 dias (BHAN *et al.*, 1989; CRAVIOTO *et al.*, 1991), visto em estudos em países em desenvolvimento.

Esta classe de *E. coli* é considerada a segunda causa mais comum da chamada “diarreia dos viajantes”, porque estas cepas podem estar presentes em alimentos provenientes de áreas onde a infecção é endêmica, e onde a infecção pode ser assintomática (ADACHI *et al.*, 2002; ADACHI *et al.*, 2001).

No padrão AA as bactérias aderem-se umas as outras, à superfície das células HEp-2, e também à superfície da lamínula na ausência de células, em uma forma que lembra tijolos empilhados, formando agregados heterogêneos (NATARO *et al.*, 1987).

Por ser um grupo heterogêneo, a sua identificação é complicada (HUANG *et al.*, 2004). Acredita-se que a patogênese de EAEC envolve a aderência na mucosa intestinal por fimbrias, codificadas pelos genes de virulência *aggA* e *aggfA* que estão inseridos em um plasmídio de 60 MDa, que por sua vez codifica um ativador transcricional dos genes de virulência, denominado AggR (NATARO;

KAPER, 1998). Após disso, tem um aumento na produção de muco por parte da célula hospedeira, formando um biofilme no local, e por último ocorre uma resposta inflamatória com liberação de citocina, aumentando a secreção de fluido intestinal (JIANG *et al.*, 2002).

Um estudo com voluntários demonstrou que a ingestão de 10^{10} UFC de EAEC causou diarreia (NATARO *et al.*, 1995), entretanto, ainda não se sabe a dose infectante (HUANG *et al.*, 2004).

Os sorotipos de EAEC mais freqüentes foram relatados por Nataro e Kaper (1998): O3:H2, O15: H18, O86:NM, O77:H18, O111:H12, O111:H21 e O127:H2. Mas a sorotipagem não é uma grande ajuda para representar às cepas de EAEC devido a um grande número de cepas imóveis ou não tipáveis quanto ao antígeno H (KNUTTON *et al.*, 1992; UBER *et al.*, 2006; VIAL *et al.*, 1988).

1.3.4 ETEC

ETEC foi descrita por primeira vez na Índia (GORBACH *et al.*, 1971; SACK, 1980) e é considerado o segundo maior grupo de *E. coli* associada a diarreia (HART; BATT; SAUNDERS, 1993; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

É conhecida como agente causador da “diarreia dos viajantes” entre adultos de países desenvolvidos visitando áreas endêmicas, onde infecções por ETEC são frequentemente assintomáticas e as condições higiênico-sanitárias são precárias, e diarreia infantil de 1 a 5 anos de idade (NATARO; KAPER, 1998).

As infecções causadas por ETEC pode variar desde uma diarreia leve até tipo cólera desidratante e fatal (BLACK, 1993). Além disso, pode causar diarreia em animais domésticos, o que leva a perdas econômicas na criação de bovinos, caprinos, suínos e aves (GUTH, 2000; HIRST, 1999).

A patogenicidade de ETEC é resultante pela produção de dois tipos de enterotoxinas: termo-lábil (LT), termo-estável (ST). A toxina LT é muito similar com a toxina colérica. Além disso, apresentam fatores de colonização (CFs), que são proteínas de superfície que reconhecem receptores específicos (glicoproteínas) no epitélio intestinal (COHEN; GIANNELLA, 1995).

Os genes *est*, *elt* codificam as toxinas LT e ST respectivamente e são encontrados em plasmídios, entretanto alguns genes que codificam ST foram encontrados em transposons (NATARO; KAPER, 1998).

A transmissão da infecção por ETEC é fecal-oral pela ingestão de água ou de alimentos contaminados (CLARKE, 2001; DANIELS *et al.*, 2000), com uma dose infectante de aproximadamente 10^8 UFC. A infecção é caracterizada por diarreia aquosa, náusea, vômito, cólicas abdominais e febre baixa (NATARO; KAPER, 1998).

1.3.5 EIEC

É a terceira classe de *E. coli* associada com diarreia, semelhante a *Shigella* spp. na patogenia e nos antígenos somáticos (DUPONT *et al.*, 1971). Cepas de EIEC são frequentemente não móveis, são menos ativos bioquimicamente que tEPEC, não tem produção de gás e não descarboxila a lisina (TOLEDO; TRABULSI, 1983).

O reservatório de EIEC é o ser humano e é causa significativa de mortalidade em crianças de países desenvolvidos. A transmissão é por contato pessoal ou pela ingestão de alimentos contaminados (GORDILLO *et al.*, 1992; HARRIS *et al.*, 1985).

Como algumas espécies de *Shigella*, estas cepas invasivas apresentam plasmídios de alto peso molecular de 140 MDa, o gene *ipaH* está inserido dentro de este plasmídio, determinando o mecanismo de invasão (HALE *et al.*, 1983; HARRIS *et al.*, 1982; HART *et al.*, 1993).

Estudos com voluntários demonstraram que são necessárias 10^6 UFC para provocar doença em adultos saudáveis. Sua patogenicidade deve-se a capacidade de invadir e causar inflamação e necrose na mucosa do cólon (NATARO; KAPER, 1998; SANSONETTI, 1992). A primeira etapa começa pela penetração na célula epitelial, lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimento direcional no citoplasma e extensão em direção às células epiteliais adjacentes (SANSONETTI, 1992).

Os sorotipos descritos até o momento diferem dos sorotipos clássicos de EPEC e ETEC, os mais encontrados são O28:H⁻, O29:H⁻, O112:H⁻, O124:H⁻, O124:H7, O124:H30, O135:H⁻, O136:H⁻, O144:H⁻, O152:H⁻, O167:H5 and O173:H⁻ (NATARO; KAPER, 1998; ORSKOV *et al.*, 1991).

1.4 DEC EM CÃES E GATOS

Alguns estudos indicam que a transmissão de DEC pode ocorrer entre cães e humanos. Cães assintomáticos foram identificados como portadores de linhagens de STEC patogênicas humanas, incluindo linhagens de O157:H7, e estas poderiam causar surtos de infecções por EHEC em humanos (TREVINA *et al.*, 1996).

EPEC é considerado como uma importante causa de diarreia em cães, particularmente em filhotes e seriam amostras diferentes encontradas em outras espécies. As primeiras cepas de EPEC foram detectadas por microscopia eletrônica do intestino de um filhote com oito semanas de idade (BROES *et al.*, 1988). As amostras apresentavam o sorotipo O49:H10, não era invasiva e não produzia nenhum tipo de enterotoxinas. Beaundry e colaboradores (1996) detectaram a presença do gene *bfpA* e *eae* em uma amostra de cachorro. EPEC em cães e gatos também foi identificada na Bélgica (MAINIL *et al.*, 1998); Pospischil e colaboradores (1987) detectaram a lesão A/E em dois gatos com diarreia.

Os sorogrupos clássicos de EPEC foram ocasionalmente isolados de gatos com diarreia e cães sem diarreia.

Cepas de ETEC também foram isoladas em cães com diarreia, a maioria caracterizada inicialmente pela técnica de alça ligada de coelho, por testes sorológicos e PCR, mas não foram encontradas em cães saudáveis. A maioria das ETEC não expressou a toxina ST (DROLET *et al.*, 1994; HAMMERMUELLER *et al.*, 1995; PRADA *et al.*, 1991).

A presença de fatores de patogenicidade de linhagens de *E. coli* isoladas de cães e gatos semelhantes às linhagens de origem humana, poderia ser uma evidência da transmissão da doença para humanos, ou seja, esses animais

poderiam ser considerados fontes de infecção de DEC para humanos. Além disso, sorotipos idênticos encontrados em cães, gatos e humanos seria mais um indício do potencial zoonótico dessas linhagens.

Levando em conta a proximidade existente entre esses animais de companhia e os humanos, e a importância de DEC para a saúde pública, o estudo desse microrganismo em relação à sua patogenicidade é de extrema importância sob o ponto de vista epidemiológico e preventivo.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, J. A. *et al.* Natural history of enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection among US travelers to Guadalajara, Mexico. **J Infect Dis**, v. 185, n. 11, p. 1681-1683, 2002.
- ADACHI, J. A. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. **Clin Infect Dis**, v. 32, n. 12, p. 1706-1709, 2001.
- ADU-BOBIE, J. *et al.* Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 3, p. 662-668, 1998.
- ALBERT, M. J. *et al.* Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 4, p. 973-977, 1995.
- ALMEIDA, P. M. P. Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* produtora de lesão "attaching and effacing" (AEEC) isoladas de cães na região metropolitana do estado do Rio de Janeiro. 2005. (Mestrado em Clínica Veterinária). Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói.
- BERTIN, Y. *et al.* Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 9, p. 3060-3065, 2001.
- BEUTIN, L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. **Vet Res**, v. 30, n. 2-3, p. 285-298, 1999.
- BHAN, M. K. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. **J Infect Dis**, v. 159, n. 6, p. 1061-1064, 1989.
- BHATNAGAR, S. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* may be a new pathogen causing acute and persistent diarrhea. **Scand J Infect Dis**, v. 25, n. 5, p. 579-583, 1993.
- BJURSTROM, L. Aerobic bacteria occurring in the vagina of bitches with reproductive disorders. **Acta Vet Scand**, v. 34, n. 1, p. 29-34, 1993.
- BLACK, R. E. Epidemiology of diarrhoeal disease: implications for control by vaccines. **Vaccine**, v. 11, n. 2, p. 100-106, 1993.
- BLANCO, M. *et al.* Genes coding for Shiga-like toxins in bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) strains belonging to different O:K:H serotypes. **Vet Microbiol**, v. 42, n. 2-3, p. 105-110, 1994.

- BLANCO, M. *et al.* Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. **Am J Vet Res**, v. 54, n. 9, p. 1446-1451, 1993.
- BOUZARI, S. *et al.* Adherence of non-enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **J Med Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 95-97, 1994.
- BROES, A. *et al.* Natural infection with an attaching and effacing *Escherichia coli* in a diarrheic puppy. **Can J Vet Res**, v. 52, n. 2, p. 280-282, 1988.
- CALDERWOOD, S. B. *et al.* Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. **ASM News**, v. 62, p. 118-119, 1996.
- CAMPELLONE, K. G.; LEONG, J. M. Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. **Curr Opin Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 82-90, 2003.
- CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 545-552, 2004.
- CAMPOS, L. C. *et al.* *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. **Infect Immun**, v. 62, n. 8, p. 3282-3288, 1994.
- CASTRO, A. F. P. *et al.* Virulence factors present in cultures of *Escherichia coli* isolated from pigs in the region of Concordia, Santa Catarina, Brazil. **Pesq Vet Bras**, v. 4, p. 109-114, 1984.
- CLARKE, S. C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*--an emerging problem? **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 41, n. 3, p. 93-98, 2001.
- COHEN, M. B.; GIANNELLA, R. A. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: BLASER, M. J.; SMITH, P. D., *et al* (Ed.). **Infection of Gastrointestinal Tract**. New York: Raven Press, 1995. p.691-707.
- CRAVIOTO, A. *et al.* Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. **Lancet**, v. 337, n. 8736, p. 262-264, 1991.
- DANIELS, N. A. *et al.* Traveler's diarrhea at sea: three outbreaks of waterborne enterotoxigenic *Escherichia coli* on cruise ships. **J Infect Dis**, v. 181, n. 4, p. 1491-1495, 2000.
- DE GRADO, M. *et al.* Identification of the intimin-binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol**, v. 1, n. 1, p. 7-17, 1999.
- DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. EPEC's weapons of mass subversion. **Curr Opin Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 28-34, 2005.

DO VALLE, G. R. *et al.* The traditional enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) serogroup O125 comprises serotypes which are mainly associated with the category of enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 152, n. 1, p. 95-100, 1997.

DRASAR, B. S.; HILL, M. J. Human intestinal flora. In: (Ed.). London ; New York: Academic Press, 1974. p.xii, 263 p.

DUPONT, H. L. *et al.* Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. **N Engl J Med**, v. 285, n. 1, p. 1-9, 1971.

EKLUND, M.; LEINO, K.; SIITONEN, A. Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx-positive virulence profiles. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 12, p. 4585-4593, 2002.

ELLIOTT, S. J. *et al.* The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 68, n. 11, p. 6115-6126, 2000.

ESCHERICH, T. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. **Fortsch der Med**, v. 3, p. 515-522, 1885.

FLORES, J.; OKHUYSEN, P. C. Enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 25, n. 1, p. 8-11, 2009.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Editora Atheneu. São Paulo, Brasil: 1996.

GANSHEROFF, L. J.; O'BRIEN, A. D. *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle presented for slaughter in the U.S.: higher prevalence rates than previously estimated. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 7, p. 2959-2961, 2000.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infect Immun**, v. 73, n. 5, p. 2573-2585, 2005.

GIAMMANCO, A. *et al.* Characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic *E. coli* serogroups isolated in Italy from children with diarrhea. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 3, p. 689-694, 1996.

GILES, C.; SANGSTER, G. An outbreak of infantile gastro-enteritis in Aberdeen; the association of a special type of *Bact. coli* with the infection. **J Hyg (Lond)**, v. 46, n. 1, p. 1-9, 1948.

GIRON, J. A.; HO, A. S.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 710-713, 1991.

- GOMES, T. A. *et al.* Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without diarrhea in Sao Paulo city, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 12, p. 3609-3613, 1998.
- GONZALEZ, R. *et al.* Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 5, p. 1103-1107, 1997.
- GOOSNEY, D. L.; DEVINNEY, R.; FINLAY, B. B. Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. **Infect Immun**, v. 69, n. 5, p. 3315-3322, 2001.
- GORBACH, S. L. *et al.* Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. I. Alterations in intestinal microflora. **J Clin Invest**, v. 50, n. 4, p. 881-889, 1971.
- GORDILLO, M. E. *et al.* Molecular characterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 4, p. 889-893, 1992.
- GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiol Rev**, v. 13, p. 60-98, 1991.
- GUTH, B. E. Enterotoxigenic *Escherichia coli* - An Overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 95-97, 2000.
- HACKER, J.; KAPER, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annu Rev Microbiol**, v. 54, p. 641-679, 2000.
- ALE, T. L. *et al.* Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, and *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 40, n. 1, p. 340-350, 1983.
- HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol Lett**, v. 254, n. 1, p. 12-18, 2006.
- HARRIS, J. R. *et al.* Person-to-person transmission in an outbreak of enteroinvasive *Escherichia coli*. **Am J Epidemiol**, v. 122, n. 2, p. 245-252, 1985.
- HARRIS, J. R. *et al.* High-molecular-weight plasmid correlates with *Escherichia coli* enteroinvasiveness. **Infect Immun**, v. 37, n. 3, p. 1295-1298, 1982.
- HART, C. A.; BATT, R. M.; SAUNDERS, J. R. Diarrhoea caused by *Escherichia coli*. **Ann Trop Paediatr**, v. 13, n. 2, p. 121-131, 1993.
- HARTLAND, E. L. *et al.* Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. **Mol Microbiol**, v. 32, n. 1, p. 151-158, 1999.

HIRST, T. R. Cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. In: ALOUF, J. E. e FREER, J. H. (Ed.). **The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins**. London: Academic Press, 1999. p.104-129.

HUANG, D. B. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. **Am J Gastroenterol**, v. 99, n. 2, p. 383-389, 2004.

ITOH, Y. *et al.* Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 10, p. 2546-2550, 1997.

JACEWICZ, M. *et al.* Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. XI. Isolation of a shigella toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide. **J Exp Med**, v. 163, n. 6, p. 1391-1404, 1986.

JANN, K.; JANN, B. J. Capsules of *Escherichia coli*. In: SUSSMAN, M. (Ed.). **Escherichia coli: Mechanisms of virulence**. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1977. p.113-143.

JERSE, A. E. *et al.* A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 20, p. 7839-7843, 1990.

JIANG, Z. D. *et al.* Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 11, p. 4185-4190, 2002.

JOHNSON, W. M.; LIOR, H.; BEZANSON, G. S. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. **Lancet**, v. 1, n. 8314-5, p. 76, 1983.

KAPER, J. B. Defining EPEC. **Rev Microbiol**, v. 27 (suppl. 1), p. 130-133, 1996.

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

KENNY, B. *et al.* Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 511-520, 1997.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial adhesins: function and structure. **Int J Med Microbiol**, v. 290, n. 1, p. 27-35, 2000.

KNUTTON, S. *et al.* Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. **Infect Immun**, v. 60, n. 5, p. 2083-2091, 1992.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 18, n. 3, p. 775-779, 1977.

- LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J Infect Dis**, v. 155, n. 3, p. 377-389, 1987.
- LEVINE, M. M. *et al.* *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet**, v. 1, n. 8074, p. 1119-1122, 1978.
- LICENCE, K. *et al.* An outbreak of *E. coli* O157 infection with evidence of spread from animals to man through contamination of a private water supply. **Epidemiol Infect**, v. 126, n. 1, p. 135-138, 2001.
- MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? **J Appl Microbiol**, v. 98, n. 6, p. 1332-1344, 2005.
- MCDANIEL, T. K. *et al.* A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 5, p. 1664-1668, 1995.
- MELLIES, J. L. *et al.* The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). **Mol Microbiol**, v. 33, n. 2, p. 296-306, 1999.
- MELTON-CELSA, A. R.; O'BRIEN, A. D. Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In: KAPER, J. B. e O'BRIEN, A. D. (Ed.). ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains**. Washington, D.C.: ASM Press, 1996. p.121-128.
- MICHINO, H. *et al.* Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. **Am J Epidemiol**, v. 150, n. 8, p. 787-796, 1999.
- MOON, H. W. *et al.* Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect Immun**, v. 41, n. 3, p. 1340-1351, 1983.
- NATARO, J. P. *et al.* Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **J Infect Dis**, v. 171, n. 2, p. 465-468, 1995.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- NATARO, J. P. *et al.* Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr Infect Dis J**, v. 6, n. 9, p. 829-831, 1987.
- NETER, E. *et al.* Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v. 16, n. 6, p. 801-808, 1955.

- NEVES, B. C. *et al.* CesD2 of enteropathogenic *Escherichia coli* is a second chaperone for the type III secretion translocator protein EspD. **Infect Immun**, v. 71, n. 4, p. 2130-2141, 2003.
- IEMANN, H. H.; SCHUBERT, W. D.; HEINZ, D. W. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. **Microbes Infect**, v. 6, n. 1, p. 101-112, 2004.
- O'BRIEN, A. D. *et al.* Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. **J Infect Dis**, v. 146, n. 6, p. 763-769, 1982.
- O'BRIEN, A. O. *et al.* *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. **Lancet**, v. 1, n. 8326 Pt 1, p. 702, 1983.
- ORSKOV, I.; ORSKOV, F. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. **J Hyg (Lond)**, v. 95, n. 3, p. 551-575, 1985.
- ORSKOV, I. *et al.* Two new *Escherichia coli* O groups: O172 from "Shiga-like" toxin II-producing strains (EHEC) and O173 from enteroinvasive *E. coli* (EIEC). **APMIS**, v. 99, n. 1, p. 30-32, 1991.
- OVERALL JR., J. C. Neonatal bacterial meningitis. Analysis of predisposing factors and outcome compared with matched control subjects. **J Pediatr**, v. 76, n. 4, p. 499-511, 1970.
- PAUL, M. *et al.* The significance of enteroaggregative *Escherichia coli* in the etiology of hospitalized diarrhoea in Calcutta, India and the demonstration of a new honey-combed pattern of aggregative adherence. **FEMS Microbiol Lett**, v. 117, n. 3, p. 319-325, 1994.
- PECHERE, J. C. Facteurs microbiologiques de pathogénicité l' exemple de *E. coli*. In: KHOURY, S. (Ed.). **Urologie Pathologie Infectieuse et Parasitaire**. Masson, Paris, 1985. p.7-52.
- PEETERS, J. E. *Escherichia coli* infections in rabbit, cats, dogs, cats and horses. In: GYLES, C. L. (Ed.). **Escherichia coli in Domestic Animals and Humans**. CAB International, Wallingford, UK, 1994. p.261-283.
- PHILLIPS, A. D.; FRANKEL, G. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. **J Infect Dis**, v. 181, n. 4, p. 1496-1500, 2000.
- RILEY, L. W. *et al.* Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N Engl J Med**, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.
- ROBINS-BROWNE, R. M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. **Rev Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 28-53, 1987.

- ROBINS-BROWNE, R. M. *et al.* Adherence characteristics of attaching and effacing strains of *Escherichia coli* from rabbits. **Infect Immun**, v. 62, n. 5, p. 1584-1592, 1994.
- RODRIGUES, J. *et al.* Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infect Immun**, v. 64, n. 7, p. 2680-2686, 1996.
- ROSA, A. C. *et al.* Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **J Med Microbiol**, v. 47, n. 9, p. 781-790, 1998.
- ROTTNER, K.; STRADAL, T. E.; WEHLAND, J. Bacteria-host-cell interactions at the plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion. **Dev Cell**, v. 9, n. 1, p. 3-17, 2005.
- RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J Infect Dis**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754, 2000.
- SACK, R. B. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: identification and characterization. **J Infect Dis**, v. 142, n. 2, p. 279-286, 1980.
- SANCHEZ-SANMARTIN, C. *et al.* Transcriptional regulation of the orf19 gene and the tir-cesT-eae operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 183, n. 9, p. 2823-2833, 2001.
- SANSONETTI, P. J. Molecular and cellular biology of *Shigella flexneri* invasiveness: from cell assay systems to shigellosis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 180, p. 1-19, 1992.
- SCALETSKY, I. C. *et al.* EPEC adherence to HEp-2 cells. **Rev Microbiol**, v. 27 (suppl. I), p. 17-21, 1996.
- SCALETSKY, I. C.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect Immun**, v. 45, p. 534-536, 1984.
- SCHMIDT, H. *et al.* Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. **Infect Immun**, v. 61, n. 2, p. 534-543, 1993.
- SCOTLAND, S. M. *et al.* Use of gene probes and adhesion tests to characterise *Escherichia coli* belonging to enteropathogenic serogroups isolated in the United Kingdom. **J Med Microbiol**, v. 44, n. 6, p. 438-443, 1996.
- SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol Rev**, v. 60, n. 1, p. 167-215, 1996.

SEKIYA, K. *et al.* Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 20, p. 11638-11643, 2001.

SENERWA, D. *et al.* Colonization of neonates in a nursery ward with enteropathogenic *Escherichia coli* and correlation to the clinical histories of the children. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 11, p. 2539-2543, 1989.

SMITH, J. The association of certain types (alpha and beta) of *Bact. coli* with infantile gastro-enteritis. **J Hyg (Lond)**, v. 47, n. 3, p. 221-226, 1949.

SOUZA, E.C. *et al.* Etiologic profile of acute diarrhea in children in Sao Paulo. **J Pediatr (Rio J)**, 78, 31-38.

STONE, K. D. *et al.* A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. **Mol Microbiol**, v. 20, n. 2, p. 325-337, 1996.

TESH, V. L.; O'BRIEN, A. D. The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. **Mol Microbiol**, v. 5, n. 8, p. 1817-1822, 1991.

TOLEDO, M. R.; TRABULSI, L. R. Correlation between biochemical and serological characteristics of *Escherichia coli* and results of the Sereny test. **J Clin Microbiol**, v. 17, n. 3, p. 419-421, 1983.

TORRES, M. E. *et al.* Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 6, p. 2134-2139, 2001.

TOUZE, T. *et al.* Self-association of EPEC intimin mediated by the beta-barrel-containing anchor domain: a role in clustering of the Tir receptor. **Mol Microbiol**, v. 51, n. 1, p. 73-87, 2004.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia Médica**. Editora Atheneu, 4° Ed. Sao Paulo, Brasil: 2004.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 5, p. 508-513, 2002.

TREVENA, W. B. *et al.* Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals. **Vet Rec**, v. 138, n. 16, p. 400, 1996.

UBER, A. P. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. **FEMS Microbiol Lett**, v. 256, n. 2, p. 251-257, 2006.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.

VIAL, P. A. *et al.* Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. **J Infect Dis**, v. 158, n. 1, p. 70-79, 1988.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **J Med Microbiol**, v. 56, n. Pt 1, p. 4-8, 2007.

WHIPP, S. C.; RASMUSSEN, M. A.; CRAY, W. C., JR. Animals as a source of *Escherichia coli* pathogenic for human beings. **J Am Vet Med Assoc**, v. 204, n. 8, p. 1168-1175, 1994.

WOOLEY, R. E.; BLUE, J. L. Bacterial isolations from canine and feline urine. **Mod Vet Pract**, v. 57, n. 7, p. 535-538, 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programme for control of diarrhoeal diseases. In: (Ed.). **Manual for laboratory investigations of acute enteric infections**. World Health Organization, Geneva, 1987. p.9-28.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **State of the art of vaccine research and development**. Geneva. 2005

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

O trabalho tem como principal objetivo isolar DEC em fezes de cães e gatos, e verificar o potencial zoonótico dessas amostras.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Isolar e identificar amostras de *E. coli* em fezes de cães e gatos com e sem diarreia.
- Determinar a presença de fatores de virulência em amostras de DEC isoladas de cães e gatos com e sem diarreia.
- Caracterizar fenotipicamente amostras de DEC isoladas no trabalho.
- Verificar se os sorotipos dos isolados são encontrados em DEC de origem humana.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA *VETERINARY MICROBIOLOGY*

4.1 Detection of Diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats in Brazil

Juan Puño-Sarmiento¹, Leonardo Medeiros¹, Carolina Chiconi², Fernando Martins³, Jacinta Pelayo¹, Sérgio Rocha¹, Jorge Blanco⁴, Miguel Blanco⁴, Marcelo Zanutto², Renata Kobayashi¹, Gerson Nakazato¹

Abstract: *Escherichia coli* are gut microbiota bacteria that can cause disease in some humans and other animals, including dogs and cats that humans often keep as pets. *E. coli* diarrheagenic (DEC) strains are classified into six categories: enteropathogenic (EPEC), enterotoxigenic (ETEC), Shiga toxin-producing (STEC), enteroinvasive (EIEC), enteroaggregative (EAEC), and diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC). In this study 144 and 163 *E. coli* colonies were isolated from the fecal samples of 50 dogs and 50 cats, respectively, with and without diarrhea from a Veterinary Hospital (clinical isolates). The virulence factors were determined using multiplex Polymerase Chain Reaction. Only for DEC strains were performed adherence to HEp-2 and HeLa cells assays, antimicrobial resistance and serotype (somatic or flagellar antigens). We found 25 (17.4%) and 4 (2.5%) *E. coli* diarrheagenic strains isolated from dogs and cats, respectively. Only the EPEC and EAEC pathotypes were found in both animals. Meanwhile, genes from other pathotypes (STEC, EIEC, and ETEC) were not found in these clinical isolates. The adherence capacity of cells in culture was examined. All of the diarrheagenic strains showed mannose-resistant adherence to HEp-2 and HeLa cells, and aggregative adherence was predominant in these isolates. Multiresistant strains to antimicrobials were found in most diarrheagenic strains including usual and unusual antimicrobials in veterinary practices. The serotypes of these DEC isolates were variable. The strain ONT serogroup was predominant in these isolates. Some serotypes found in our study were described to human DEC. Here, we demonstrated that pets carry virulent DEC genes, which are mainly strains of EPECs and EAECs. The presence of these

¹ Department of Microbiology, Center of Sciences Biological, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

² Department of Veterinary Clinical, Center of Agrarian Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

³ Laboratory of Bacteriology, Instituto Butantã, São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁴ Department of Microbiology and Parasitology, Universidad Santiago de Compostela, Lugo, Galicia, Spain

virulence factors in isolates from animals without diarrhea suggests that pets can act as a reservoir for human infections.

Keywords: *Escherichia coli*. Diarrhea. Pets. Animals. Virulence factors. Zoonosis.

1 Introduction

Escherichia coli strains can cause several enteric disease and extra-intestinal diseases, most of which include diarrhea, dysentery, hemolytic uremic syndrome, bladder infections, septicemia, pneumonia, and meningitis (Kaper et al., 2004). *E. coli* is a normal commensal inhabitant of the gut in humans and other warm-blooded animals.

Previously, the most extensive investigations of *E. coli* infection have been described in cattle, sheep, and pigs. However, recently dogs and cats that live in close proximity with humans could become a focus of disease transmission studies. Because the contact between humans and pets has increased, the possibility of pathogenic micro-organism transmission between these organisms is very high.

The virulence markers associated with diarrheagenic *E. coli* fall into five categories in dogs and cats (Beutin, 1999): Enteropathogenic (EPEC), Enterotoxigenic (ETEC), Enteroinvasive (EIEC), Shiga toxin-producing (STEC), and Enteroaggregative (EAEC).

Some animal diarrheagenic *E. coli* induce attaching and effacing (A/E) lesions in the gut mucosa leading to diarrheal disease. The first cases of EPEC were detected in dogs using an electron microscope to study the intestines of a puppy (Broes et al., 1988). Since then, there have been two reported cases in cats (Pospischil et al., 1987). *E. coli* strains possessing virulence markers have been isolated from healthy and diarrheic dogs and cats (Beaudry et al., 1996; Beutin, 1999; Goffaux et al., 2000; Morato et al., 2009; Nakazato et al., 2004; Peeters, 1994).

STEC strains expressing one or more different types of cytotoxins STx1 and STx2 (Caprioli et al., 2005) can cause hemolytic uremic syndrome (HUS) in humans, a systemic complication that can lead to death (Eklund et al., 2002).

Cattle and other ruminants were identified as a major natural reservoir for STEC (Blanco et al., 2001; Mercado et al., 2004), but dogs and cats can also serve as reservoirs of STEC strains (Bentancor et al., 2007; Staats et al., 2003). Moreover, EHEC 0157:H7 was found in dog feces (Trevena et al., 1996).

The occurrence of ETEC in pets and their role in diarrheal illness is less well defined. ETECs are well known in humans (Nataro and Kaper, 1998), calves and pigs (Holland, 1990). ETEC strains have been reported in dogs (Beutin, 1999; Hammermueller et al., 1995; Olson et al., 1985; Prada et al., 1991) but few strains have been studied in cats.

EIEC and EAEC are studied mainly in human infections. The role of these *E. coli* strains and their virulence factors in diarrhea is not well known and requires further investigation.

This article will focus in diarrheagenic *E. coli* in dogs and cats and the possibility that transmission of these micro-organisms between different host species and humans can be extremely high.

2 Materials and Methods

2.1 Fecal samples and bacterial strains

From January to December 2011, fecal specimens were collected from 50 dogs and 50 cats with a variety of ages, both with and without diarrhea from a Veterinary Hospital at the Universidade Estadual de Londrina. All of the animals were from the city of Londrina, in the northern state of Paraná, Brazil. Approximately 1 g of feces was collected using cotton swabs, which were then transported to the laboratory in plastic containers containing Cary-Blair medium (Difco®). The samples were stored at 22°C and then cultured within 24 h using MacConkey agar (Difco®) plates which were then incubated at 37°C for 24 h. These procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Research from Universidade Estadual de Londrina (protocol number 24/2010). Three to four colonies from each plate were selected and examined using biochemical assays (Ewing, 1986; Toledo et al., 1982a,

1982b) to confirm the presence of *E. coli*. Approximately 307 *E. coli* isolates were examined in this study. The samples were stored in Brain Heart Infusion (BHI) (Difco®) plus 20% glycerol (Sigma®) media at -80 °C. For positive and negative controls in the PCR and adherence assays the following reference strains used: *E. coli* E2348/69 (O127:H6, *eae+*, *bfpA+*, localized adherence), DEPEC 008 (O98:H28, *eae+*, localized adherence like), *E. coli* EDL 933 (O157:H7, *eae+*, *stx1+*, *stx2+*, *ehxA+*), EAEC O42 (*aggR+*, aggregative adherence), EIEC EDL 1284 (*ipaH+*), ETEC H10407 (*elt+*), ETEC B41 (*est+*), and *E. coli* K12C600 (negative control).

2.2 DNA extraction

All strains were grown on Trypticase Soy Agar (Difco®) at 37°C for 24 h. DNA was extracted by suspending five bacterial colonies in 200 µl of sterile water that was boiled for 10 min and centrifuged at 10,000 g for 5 min. The supernatant was used as the template in the PCR assays.

2.3 Detecting virulence genes using polymerase chain reaction (PCR)

The presence of virulence genes was examined using two multiplex PCR techniques. The following virulence markers were used to detect diarrheagenic *E. coli*: *eae* (structural gene for intimin of EPEC and EHEC), *bfpA* (structural gene for the BFP of typical EPEC), *aggR* (transcriptional activator for the AAFs of EAEC), *elt*, and *est* (enterotoxins of ETEC), *ipaH* (invasion plasmid antigen H found in EIEC *Shigella*), *stx* (Shiga toxins 1, 2), and *hly* (hemolysin, which can be found in STEC). Multiplex PCR test methods described previously (Aranda et al., 2007; Paton and Paton, 1998) were used with slight modifications. DNA sequence, size, and amplification cycles are described in Tables 1 and 2. The amplification of bacterial DNA was performed using 2.5 µl of supernatant in 25 µl of reaction mixture, which contained 1.5 U *Taq* polymerase (Invitrogen®), 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP, Invitrogen®), 2.5 mM MgCl₂, and 2.5 µl PCR Buffer 10X (Invitrogen®) and the appropriate primers (Tables 1 and 2). The samples were

subject to PCR in a thermal cycler (Applied Biosystems®) with an annealing temperature of 52°C and 65°C, as used by Aranda and collaborators (2007) and Paton & Paton (1998), respectively. Ten microliters of each reaction mixture were subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel followed by staining with 1 µl Gel Red (Biotium®) and visualization in a UV transilluminator. A 1 Kb DNA ladder (Invitrogen®) was run on each gel.

Table 1 - PCR primers described by Aranda and collaborators (2007).

Gene	PCR primer	Primer sequence (5'- 3')	Fragment (bp)	Concentration (pmol)	Reference
<i>eaeA</i>	eae1	CTGAACGGCGATTACGCGAA	917	10	(Aranda et al., 2004)
	eae2	CCAGACGATACGATCCAG			
<i>bfpA</i>	BFP1	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326	1.25	(Aranda et al., 2004)
	BFP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA			
<i>aggR</i>	aggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	254	2.5	(Toma et al., 2003)
	aggRksa2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC			
<i>elt</i>	LTf	GGCGACAGATTATACCGTGC	450	0.25	(Aranda et al., 2004)
	LTr	CGGTCTCTATATCCCTGTT			
<i>est</i>	Stf	ATTTTTMTTCTGTATRTCTT	190	6.47	(Aranda et al., 2004)
	Str	CACCCGGTACARGCAGGATT			
<i>ipaH</i>	lpaH1	GTTCTTGACCGCTTCCGATACCGTC	600	1	(Aranda et al., 2004)
	lpaH2	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC			
<i>stx</i>	Vtcom-u	GAGCGAAATAATTTATATGTG	518	6	(Toma et al., 2003)
	Vtcom-d	TGATGATGGCAATTCAGTAT			

Table 2 - PCR primers described by Paton & Paton (1998).

Gene	PCR primer	Primer sequence (5'- 3')	Fragment (bp)	Concentration (pmol)	Reference
<i>eaeA</i>	eaeA-F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	10	(Paton and Paton, 1998)
	eaeA-R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG			
<i>stx1</i>	Stx1-F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180	10	(Paton and Paton, 1998)
	Stx1-R	AGAACGCCCACTGAGATCATC			
<i>stx2</i>	Stx2-F	GCGACTGTCTGAAACTGCTCC	255	10	(Paton and Paton, 1998)
	Stx2-F	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG			
<i>ehxA</i>	hlyA-F	GCATCATCAAGCGTAGCTTCC	534	10	(Paton and Paton, 1998)
	hlyA-R	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT			

2.4 Adherence assays

E. coli adherence to HEP-2 and HeLa cells was detected as previously described (Cravioto et al., 1979) with slight modification. Cells were grown in 24-well tissue culture microplates (BD Falcon, Bedford, MA, USA) in which sterile round cover slips (13 mm in diameter) were placed prior to inoculation. The growth medium in each well of the microplate consisted of 0.9 ml of Eagle's minimal essential medium (MEM, Invitrogen®) supplemented with 10% fetal calf serum

(Invitrogen®) and a 1% antibiotic solution (penicillin 100,000 U and streptomycin 100 µg/ml, Sigma®). HEp-2 and HeLa monolayers were grown overnight at 37 °C with 5 % CO₂ to yield at least 70% confluence. The slides were washed three times with sterile phosphate buffered saline 0.05 M, pH 7,4 (PBS). Forty microliters of the overnight bacterial culture were incubated in Trypticase Soy Broth (TSB, Difco®) at 37 °C and added to 0.96 ml of MEM containing 2% fetal calf serum and 3% D-Mannose (Sigma®). After 3 h of incubation at 37 °C with 5% CO₂, the monolayers were washed with sterile PBS and incubated for an additional 3 h. Next, the slides were washed five times with PBS, fixed with absolute methanol for 10 min and stained with May-Grunwald and Giemsa. The slides were examined under a light microscope oil immersion lens. To determine the adhesion pattern previously described criteria were used (Nataro et al., 1987; Rodrigues et al., 1996; Scaletsky et al., 1999).

2.5 Antimicrobial susceptibility was tested using the agar diffusion technique

Antimicrobial-resistance phenotypes were determined using the agar disk diffusion method as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). The following antimicrobial agents were used: amoxicillin (AC, 10 µg), amoxicillin-clavulanic acid (AMC, 30 µg), aztreonam (ATM, 30 µg), tetracycline (TET, 30 µg), cefotaxime (CTX, 30 µg), imipenem (IPM, 10 µg), nalidixic acid (NAL, 30 µg), gentamicin (GEN, 10 µg), chloramphenicol (CHL, 30 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 25 µg), ampicillin (AMP, 10 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), and streptomycin (STR, 10 µg). Enrofloxacin (EFX, 5 µg) was also tested because this antimicrobial is commonly used in veterinary clinics. Only isolates that exhibited some virulence factor were tested for antimicrobials.

2.6 Serotyping

Isolate serotyping was performed using standard agglutination methods with antisera to somatic O (O1-O185) and flagellar H (H1-H56) antigens (Guinée et al., 1981) from the *E. coli* Reference Laboratory, Santiago de Compostela University, Lugo, Spain.

2.7 Statistical analysis

The data were expressed as the means \pm SD. The bacterial groups were compared using χ^2 (Chi-square test) for independent samples; differences were considered significant at $P < 0.05$. The statistical analyses were performed using BioEstat version 5.0 software.

3 Results

3.1 *E. coli* isolates

Isolates from 307 *E. coli* colonies (144 from dogs and 163 from cats) were obtained from a Veterinary Hospital (clinical strains). Of these isolates, 68 were fecal samples from dogs with diarrhea and 83 isolates were from cats with diarrhea. These isolates showed a variable biochemical profile including non-fermentative lactose and samples that were lysine decarboxylase negative.

3.2 Diarrheagenic *E. coli* virulence factors

Of all isolates, the following were positive for virulence factors: 25 of 144 (17.4%) were from dogs, and 4 of 163 (2.5%) were from cats. In dogs, 17 of 68 (25.0%) were isolated from dogs with diarrhea, while 8 of 76 (10.5%) were isolated from dogs without diarrhea. In cats, 1 of 82 (1.2%) isolates were from cats with diarrhea, while 3 of 81 (3.7%) were isolated from cats without diarrhea (Table 3). These results demonstrate that a greater number of dogs carry the virulence factors

compared with the number of cat isolates ($p < 0.05$). Furthermore diarrheagenic *E. coli* strains may be associated with diarrhea in dogs ($p < 0.05$).

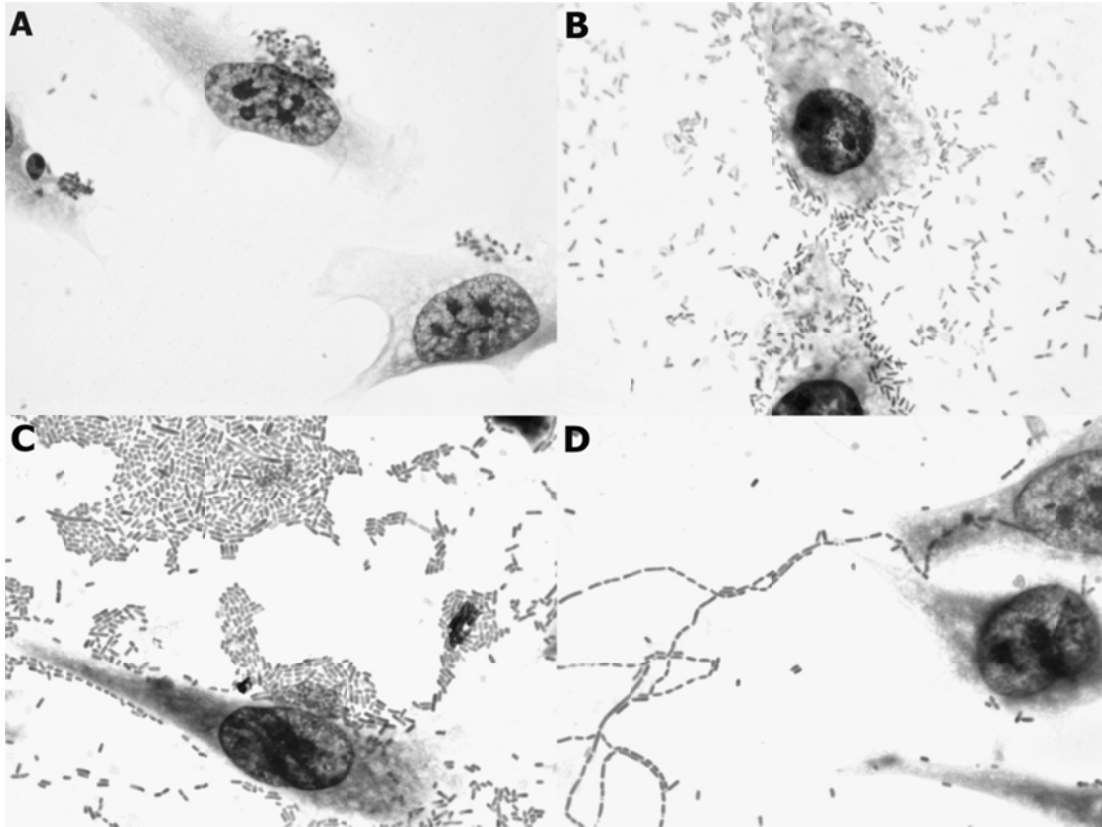
The *eaeA* gene (EPEC) was found in 12 of 68 (17.6%) clinical isolates from dogs with diarrhea, and 5 of 76 (6.6%) from dogs without diarrhea. For cats, the *eaeA* gene was found in 1 of 82 (1.2%) from cats with diarrhea and 2 of 81 (2.5%) from cats without diarrhea (table 3). The *aggR* gene (EAEC) was found in 5 of 68 (7.4%) clinical isolates from dogs with diarrhea, and 3 of 76 (3.9%) from dogs without diarrhea. In cats without diarrhea, only 1 of 81 (1.2%) showed this gene (table 3). There was no difference between the number of strains carrying the *eaeA* gene and carrying the *aggR* gene isolated from dogs without diarrhea, but there was a difference in dogs with diarrhea ($p < 0.05$).

3.3 Adherence to HEp-2 and HeLa cells

All of the *E. coli* isolates adhered to both HEp-2 and HeLa after 6 h with 3% D-mannose (mannose-resistant). These adherent strains showed different adherence patterns such as aggregative (58.6%) (Figure 1C), diffuse (10.3%) (Figure 1B), localized-like (24.1%) (Figure 1A), non-characteristic (3.4%), and chain-like adherent (3.4%) (Figure 1D) ($p < 0.05$). These adherence patterns were equal for both HEp-2 and HeLa cells.

Among the aEPEC isolates, seven (35.0%) showed localized-like adherence (Figure 1A). Thus, 22 isolates showed other adherence patterns (aggregative, diffuse, non-characteristic and chain-like adherent). Six (66.7%) EAEC isolates showed aggregative adherence (figure 1B).

Figure 1 - Adherence patterns of diarrheagenic *E. coli* isolated in this study (microscope magnification of 1000X):



A) HD-3 (atypical EPEC) strain showing localized adherence-like pattern on HeLa cells; B) DD-14 strain showing diffuse adherence on HEp-2 cells, C) DD-9 strain showing aggregative adherence on HeLa cells; D) DD-12 (atypical EPEC) strain showing a chain-like pattern of adherence to HeLa cells.

3.4 Antimicrobial susceptibility

Antimicrobial susceptibility was observed in 21 of 25 (84.0%) and 2 of 4 (50.0%) isolates from dogs and cats with diarrheagenic *E. coli*, respectively, who were resistant to one or more antimicrobial groups. Thus, diarrheagenic isolates from dogs are more resistant than isolates from cats ($p < 0.05$). In fact, several strains showed resistance to four or more antimicrobials.

3.5 Serotyping

The 28 clinical isolates demonstrated a variety of serotypes: ONT:H1, ONT:H5, ONT:H6, ONT:H7, ONT:H10, ONT:H15, ONT:H16, ONT:H21, O6:H31, O15:H16, O24:H4, O88:H25, O51:H10, O103:H27, O166:H15 and ONT:HNM (Table 3).

The majority of isolates were not determinate of the O serogroup (ONT); the predominant serotype was ONT:H16 (32.1%).

Table 3 - Genotypic and phenotypic characteristics of diarrheagenic *E. coli* isolates from dogs and cats.

Isolate	Animal	Clinical status	Age	Genetic profile	Pattern of adherence (HEp-2 and HeLa)	Phenotype of resistance	Serotype
DD-1	Dog	With diarrhea	3 months	<i>eae+</i>	AA	AC-AMC ⁱ -TET-AMP	ONT:H16
DD-2	Dog	With diarrhea	3 months	<i>eae+</i>	AA	AC-AMC-ATM ⁱ -TET-AMP-CIP ⁱ -STR ⁱ	ONT:H16
DD-3	Dog	With diarrhea	3 months	<i>eae+</i>	AA	AC-TET-IPM ⁱ -AMP	ONT:H16
DD-4	Dog	With diarrhea	3 months	<i>eae+</i>	AA	AC-AMC ⁱ -TET-IPM-AMP-CIP-STR	ONT:H16
DD-5	Dog	With diarrhea	4 months	<i>eae+</i>	LAL	TET-AMP ⁱ -STR	ONT:H16
DD-6	Dog	With diarrhea	4 months	<i>eae+</i>	LAL	AMC ⁱ -TET-STR	ONT:H16
DD-7	Dog	With diarrhea	4 months	<i>eae+</i>	AA	AC-ATM ⁱ -TET-IPM-AMP	ONT:H16
DD-8	Dog	With diarrhea	4 months	<i>eae+</i>	AA	TET	ONT:H16
DD-9	Dog	With diarrhea	2 months	<i>eae+</i>	AA	AMC ⁱ -STR ⁱ	ONT:H10
DD-10	Dog	With diarrhea	10 years	<i>eae+</i>	NC	TET	O15:H16
DD-11	Dog	With diarrhea	4 months	<i>eae+</i>	AA	AMC ⁱ -AMP-EFX-STR	O88:H25
DD-12	Dog	With diarrhea	4 months	<i>eae+</i>	CLA	AMP-STR ⁱ	O88:H25
DD-13	Dog	With diarrhea	6 months	<i>aggR+</i>	DA/AA	ATM ⁱ -AMP ⁱ -CIP-STR	O51:H10
DD-14	Dog	With diarrhea	6 months	<i>aggR+</i>	DA/AA	TET-IPM-CIP-STR ⁱ	O103:H27
DD-15	Dog	With diarrhea	6 months	<i>aggR+</i>	DA/AA	TET-AMP ⁱ -STR ⁱ	O103:H27
DD-16	Dog	With diarrhea	16 years	<i>aggR+</i>	AA	TET-AMP ⁱ -STR	ONT:H21
DD-17	Dog	With diarrhea	16 years	<i>aggR+</i>	AA	IPM-AMP-EFX-STR	ONT:HNM
HD-1	Dog	Without diarrhea	12 years	<i>eae+</i>	LAL	AMC ⁱ	ONT:H1
HD-2	Dog	Without diarrhea	12 years	<i>eae+</i>	LAL	TET-STR	ONT:H1
HD-3	Dog	Without diarrhea	16 years	<i>eae+</i>	LAL	AC-AMC-NAL-GEN-CHL ⁱ -AMP-CIP-EFX-STR	ONT:H6
HD-4	Dog	Without diarrhea	1 to 4 months	<i>eae+</i>	LAL	Sensible to all	ONT:H5
HD-5	Dog	Without diarrhea	12 years	<i>eae+</i>	AA	TET-AMP ⁱ	O166:H15
HD-6	Dog	Without diarrhea	6 years	<i>aggR+</i>	AA	AC-AMC ⁱ -AMP-CIP ⁱ -STR	ONT:H21
HD-7	Dog	Without diarrhea	6 years	<i>aggR+</i>	AA	AC-AMC ⁱ -AMP-STR ⁱ	ONT:H21
HD-8	Dog	Without diarrhea	13 years	<i>aggR+</i>	AA	AMC-TET-IPM-AMP-CIP-EFX-STR	ONT:H7
DC-1	Cat	With diarrhea	4 years	<i>eae+</i>	LAL	AC-AMC ⁱ -ATM ⁱ -TET-SXT-AMP-CIP-EFX-STR	O25:H4
HC-1	Cat	Without diarrhea	1 to 3 months	<i>eae+</i>	AA	STR ⁱ	O6:H31
HC-2	Cat	Without diarrhea	1 to 3 months	<i>eae+</i>	AA	Sensible to all	O6:H31
HC-3	cat	Without diarrhea	10 years	<i>aggR+</i>	AA	AMC-TET-SXT ⁱ -AMP-STR	NT

LA, localized adherence; LAL, localized adherence like; AA, aggregative adherence; DA, diffuse adherence; CLA, chain-like adherence; NC, non-characteristic adherence; NA, non-adherent.

AC, amoxicillin; AMC, amoxicillin –clavulanic acid; ATM, aztreonam; TET, tetracycline; IPM, imipenem; NAL, nalidixic acid; GEN, gentamicin; CHL, chloramphenicol; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; AMP, ampicillin; CIP, ciprofloxacin; EFX, enrofloxacin; STR, streptomycin.

ⁱ Resistance to the indicated drug is intermediate or resistant according to CLSI standards.

ONT, O antigen non typeable with O1 to O185 antisera.

NT, not tested.

4. Discussion and conclusions

Several *Escherichia coli* strains are responsible for human disease worldwide. Factors such as infection source and reservoirs have been important in determining the epidemiology of these diseases. Some animals, such as cattle, goat, pig, and others, can serve as reservoirs for human diarrheagenic *E. coli*. However, little is known of the involvement that dogs and cats have in the transmission of these pathogenic bacteria to humans.

In our study, the pathotype most prevalent in dogs and cats was EPEC (*eae+*). This gene was found in 20 *E. coli* isolates from animal fecal samples. Cases of EPEC in dogs (DEPEC) and cats (CEPEC) have been reported in Brazil (Morato et al., 2009; Nakazato et al., 2004). However, we also found another pathotype (EAEC) in our clinical isolates.

Cattle, sheep, and pigs were identified as important attaching and effacing *E. coli* (AEEC) reservoirs, with 10.4 to 19.2% of animals shedding AEEC. High rates of AEEC carriers were also found among cattle and sheep in a study conducted on 1227 slaughtered animals in England and Wales (Aktan et al., 2004), indicating that this finding reflects a common phenomenon. Furthermore, two studies showed the presence of *bfpA* gene among cats (Goffaux et al., 2000; Krause et al., 2005), suggesting that cats may also carry the typical EPEC strain, which is rarely found among *E. coli* strains in other animals. However, in our study, the typical EPEC strains (*eae+*, *bfpA+*) were not isolated from dog or cat fecal samples. Because pets live in close contact with humans, direct transmission of pathogenic bacteria is very possible. Mainil and collaborators (1998a) reported that 5% of their feline *E. coli* strains isolated from 113 non diarrheic and diarrheic animals were positive for the *eae* strain. Most of the *eae* positive strains in this study were isolated from non-diarrheic animals. Similar results were also observed in our study and could suggest that these strains are not pathogenic for dogs and cats. However, strains isolated from non-diarrheic cats do not necessarily indicate that they are not pathogenic for these animals. EPEC causes diarrhea in young animals (Beutin, 1999), and most of the dogs and cats investigated in our study were younger than 4 months (Table 3). Localized-like adherence (LAL) is common for atypical EPEC strains. In this study, only seven (28.0%) of the EPEC isolates showed LAL, while 11 (44.0%) showed

aggregative adherence. The DD-12 strain showed a different adherence pattern: the chain-like adherence that has been described by Gioppo and collaborators (2000) in human EAECs. Another interesting result was the DA/AA pattern in the three *aggR*⁺ strains. To our knowledge, the AA pattern is the only adherence pattern that is described in EAECs isolated from humans and animals. However, these results suggest that adherence patterns can vary from EPEC isolates from dogs and cats. In another study, Goffaux and collaborators (2000) showed that eight dogs (8%) excreted *eae*⁺ *E. coli* strains. In general, investigations studying the cycle of mutual transmission of pathogenic *E. coli* between humans and pets have mainly focused on transmission from dogs. In previous studies, EPEC strains have been isolated from humans and from diseased dogs living in the same house (Rodrigues et al., 2004). Similarly, fecal *E. coli* strains may be transmitted directly or indirectly between humans and pets (Nakazato et al., 2004; Rodrigues et al., 2004).

In this study, two multiplex-PCRs were performed. The protocol described by Aranda and collaborators (2007) identified five pathotypes (EPEC, ETEC, STEC, EIEC and EAEC), while in the method used by Paton and Paton (1998), only EPEC and STEC pathotypes were identified. Both techniques efficiently searched for virulence factors, but the former was difficult to standardize. Here, we used a combination of these two multiplex-PCR techniques, which were vital for EPEC identification.

The EAEC pathotype is not common in dogs or cats. Recently, EAEC has become increasingly important due to an *E. coli* O104:H4 outbreak that occurred in Germany in 2011; in this outbreak, there was an increased genetic similarity with EAEC 55989 (Brzuszkiewicz et al., 2011). This strain carried the *stx2* gene that caused hemolytic uremic syndrome (HUS). Here, we found the *aggR* gene in eight dog isolates and one cat isolate. The presence of this gene in these animals could represent a zoonotic risk due to an increased genetic transference that occurs among *E. coli* strains. Animals that serve as reservoirs are important for studying the epidemiology of these diseases, as well as the 2011 vegetable outbreak in Germany. Among the nine isolates that carried the *aggR* gene, six showed aggregative adherence, confirming the presence of the EAEC pathotype.

Recent reports in Great Britain have demonstrated that dogs in close proximity to cattle farms aid in the transmission of O157 STEC to children (Hogg et al., 2009). Although it is believed that dogs are only short-term vectors of certain STEC serotypes, they can transmit infections to other farm animals and humans (Hogg et al., 2009). In our study, clinical strains were isolated from veterinary hospital animals and the *stx* gene was not found in the *E. coli* strains isolated from these dog or cat fecal samples. We believe that other pathotypes such as STEC, ETEC and EIEC can be found in dogs and cats in different environments (i.e., from streets and farms). Therefore, additional studies are being conducted in these other pathotypes (data not shown).

In this study, several strains demonstrated a resistance to at least five of the antimicrobials tested. Aslani and collaborators (2008) previously observed that human STEC strains demonstrated a resistance to ampicillin, which reflected a higher resistance to streptomycin and tetracycline; this dual effect can be caused by the spread of mobile genetic elements or plasmids. Some *E. coli* diarrheagenic isolates showed resistance to enrofloxacin or ciprofloxacin that are commonly used in veterinary practice. However, some strains isolated in our study showed resistance to unusual antimicrobials in veterinary practice (aztreonam, imipenem, nalidixic acid and chloramphenicol). The presence of these resistant isolates suggests an acquisition of resistance gene from human *E. coli* (zoonosis aspect). This high antimicrobial resistance represents a public health hazard.

The serotypes isolated from each pathotype in this study are not commonly found in other reports (Rodriguez-Angeles, 2002). The ONT:H16 serotype was predominantly found in EPEC clinical isolates from dogs with diarrhea. The variability of serotypes and the increased presence of ONT serogroups suggest that new serotypes in dogs can cause human disease. Abe and collaborators (2009) reported that the following serotypes O88:H25, ONT:H5, ONT:H6 and ONT:H12 can be isolated from aEPEC strains in humans with diarrhea. We isolated these serotypes in *E. coli* strains isolated from dogs (table 3). These results suggest that dogs are an important reservoir for human zoonosis.

In addition, these results suggest that dogs and cats are important reservoirs for the transmission of diarrheagenic *E. coli* to humans and others host (others species of animals) because these strains carry a variety of virulence genes found in human pathogenic bacteria. Another important aspect of this work is the relationship among these strains and their antimicrobial resistance, which represents a significant public health safety hazard.

Acknowledgements

We thank the Araucária Foundation - Paraná State, and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), who enabled the execution of this study. We also thank Viviana Torres Cely, Ph.D., for providing statistical analysis. The authors also thank the Veterinary Hospital from the University of Londrina State for providing fecal samples for our research.

References

- Abe, C.M., Trabulsi, L.R., Blanco, J., Blanco, M., Dahbi, G., Blanco, J.E., Mora, A., Franzolin, M.R., Taddei, C.R., Martinez, M.B., Piazza, R.M., Elias, W.P., 2009. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae(+) EAF-negative stx(-) genetic profile. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 64, 357-365.
- Aktan, I., Sprigings, K.A., La Ragione, R.M., Faulkner, L.M., Paiba, G.A., Woodward, M.J., 2004. Characterisation of attaching-effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in England and Wales. *Vet Microbiol.* 102, 43-53.
- Aranda, K.R., Fabbriotti, S.H., Fagundes-Neto, U., Scaletsky, I.C., 2007. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. *FEMS Microbiol Lett.* 267, 145-150.

- Aranda, K.R., Fagundes-Neto, U., Scaletsky, I.C., 2004. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella spp.* J Clin Microbiol. 42, 5849-5853.
- Aslani, M.M., Ahrabi, S.S., Alikhani, Y.M., Jafari, F., Zali, R.M., Mani, M., 2008. Molecular detection and antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal cases. Saudi Med J. 29, 388-392.
- Beaudry, M., Zhu, C., Fairbrother, J.M., Harel, J., 1996. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. J Clin Microbiol. 34, 144-148.
- Bentancor, A., Rumi, M.V., Gentilini, M.V., Sardoy, C., Irino, K., Agostini, A., Cataldi, A., 2007. Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina. FEMS Microbiol Lett. 267, 251-256.
- Beutin, L., 1999. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. Vet Res. 30, 285-298.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Alonso, M.P., Gonzalez, E.A., Bernardez, M.I., 2001, Epidemiology of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants, In: Duffy, G., Garvey, P., McDowell, D.A. (Eds.) Verocytotoxigenic E. coli. Food and Nutrition Press.Trumbull, Connecticut, USA, pp. 113-278.
- Broes, A., Drolet, R., Jacques, M., Fairbrother, J.M., Johnson, W.M., 1988. Natural infection with an attaching and effacing *Escherichia coli* in a diarrheic puppy. Can J Vet Res. 52, 280-282.
- Brzuszkiewicz, E., Thurmer, A., Schuldes, J., Leimbach, A., Liesegang, H., Meyer, F.D., Boelter, J., Petersen, H., Gottschalk, G., Daniel, R., 2011. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). Arch Microbiol. 193, 883-891.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugere, H., Oswald, E., 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet Res. 36, 289-311.

- Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M., Rowe, B., 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol.* 3, 95-99.
- Eklund, M., Leino, K., Siitonen, A., 2002. Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx-positive virulence profiles. *J Clin Microbiol.* 40, 4585-4593.
- Ewing, W.H., 1986, *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. Elsevier Science Publishing Company, New York.
- Gioppo, N.M., Elias, W.P., Jr., Vidotto, M.C., Linhares, R.E., Saridakis, H.O., Gomes, T.A., Trabulsi, L.R., Pelayo, J.S., 2000. Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. *FEMS Microbiol Lett.* 190, 293-298.
- Goffaux, F., China, B., Janssen, L., Mainil, J., 2000. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. *Res Microbiol.* 151, 865-871.
- Guinée, P.A.M., Jansen, W.H., Wadström, T., Sellwood, R., 1981, *Escherichia Coli* Associated with Neonatal Diarrhoea in Piglets and Calves, In: de Lelwaw, P.W., Guinée, P.A.M. (Eds.) *Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea*. Springer Netherlands, The Netherlands, pp. 126-162.
- Hammermueller, J., Kruth, S., Prescott, J., Gyles, C., 1995. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. *Can J Vet Res.* 59, 265-270.
- Hogg, R.A., Holmes, J.P., Ghebrehewet, S., Elders, K., Hart, J., Whiteside, C., Willshaw, G.A., Cheasty, T., Kay, A., Lynch, K., Pritchard, G.C., 2009. Probable zoonotic transmission of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O 157 by dogs. *Vet Rec.* 164, 304-305.
- Holland, R.E., 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin Microbiol Rev.* 3, 345-375.

- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2, 123-140.
- Krause, G., Zimmermann, S., Beutin, L., 2005. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types. Vet Microbiol. 106, 87-95.
- Mainil, J.G., Bez, S., Jacquemin, E., Kaeckenbeeck, A., 1998a. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli* chez les chiens et chats. (I) Détection des souches entérotoxigènes (ETEC), enteropathogènes (EPEC), vérotoxigènes (VTEC), entérohémorragiques (EHEC), et nécrotoxigènes (NTEC) Ann Méd Vét. 142, 39-46.
- Mercado, E.C., Gioffre, A., Rodriguez, S.M., Cataldi, A., Irino, K., Elizondo, A.M., Cipolla, A.L., Romano, M.I., Malena, R., Mendez, M.A., 2004. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in Argentina. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 51, 82-88.
- Morato, E.P., Leomil, L., Beutin, L., Krause, G., Moura, R.A., Pestana de Castro, A.F., 2009. Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. Zoonoses Public Health. 56, 229-237.
- Nakazato, G., Gyles, C., Ziebell, K., Keller, R., Trabulsi, L.R., Gomes, T.A., Irino, K., Da Silveira, W.D., Pestana De Castro, A.F., 2004. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). Vet Microbiol. 101, 269-277.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 11, 142-201.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P., Levine, M.M., 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. Pediatr Infect Dis J. 6, 829-831.
- Olson, P., Hedhammar, A., Faris, A., Krovacek, K., Wadstrom, T., 1985. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and *Klebsiella pneumoniae* isolated from dogs with diarrhoea. Vet Microbiol. 10, 577-589.

- Paton, A.W., Paton, J.C., 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. J Clin Microbiol. 36, 598-602.
- Peeters, J.E., 1994, *Escherichia coli* infections in rabbit, cats, dogs, gats and horses, In: Gyles, C.L. (Ed.) *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallingford, UK, pp. 261-283.
- Pospischil, A., Mainil, J.G., Baljer, G., Moon, H.W., 1987. Attaching and effacing bacteria in the intestines of calves and cats with diarrhea. Vet Pathol. 24, 330-334.
- Prada, J., Baljer, G., De Rycke, J., Steinruck, H., Zimmermann, S., Stephan, R., Beutin, L., 1991. Characteristics of alpha-hemolytic strains of *Escherichia coli* isolated from dogs with gastroenteritis. Vet Microbiol. 29, 59-73.
- Rodrigues, J., Scaletsky, I.C., Campos, L.C., Gomes, T.A., Whittam, T.S., Trabulsi, L.R., 1996. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. Infect Immun. 64, 2680-2686.
- Rodrigues, J., Thomazini, C.M., Lopes, C.A., Dantas, L.O., 2004. Concurrent infection in a dog and colonization in a child with a human enteropathogenic *Escherichia coli* clone. J Clin Microbiol. 42, 1388-1389.
- Rodriguez-Angeles, G., 2002. Principal characteristics and diagnosis of the pathogenic groups of *Escherichia coli*. Salud Publica Mex. 44, 464-475.
- Scaletsky, I.C., Pedroso, M.Z., Oliva, C.A., Carvalho, R.L., Morais, M.B., Fagundes-Neto, U., 1999. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. Infect Immun. 67, 3410-3415.
- Staats, J.J., Chengappa, M.M., DeBey, M.C., Fickbohm, B., Oberst, R.D., 2003. Detection of *Escherichia coli* Shiga toxin (stx) and enterotoxin (estA and elt) genes in fecal samples from non-diarrheic and diarrheic greyhounds. Vet Microbiol. 94, 303-312.

Toledo, M.R.F., Fontes, C.F., Trabulsi, L.R., 1982a. EPM - a modification of Rugai and Araujo medium for simultaneous test of gas production from glucose, H₂S, urease and tryptophan deaminase. *Rev Microbiol.* 13, 309-315.

Toledo, M.R.F., Fontes, C.F., Trabulsi, L.R., 1982b. MILi - a medium for detection of motility, indole, and lysine decarboxylase. *Rev Microbiol.* 13, 230-235.

Toma, C., Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinen, I., Baschkier, A., Rivas, M., Iwanaga, M., 2003. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 41, 2669-2671.

Trevena, W.B., Hooper, R.S., Wray, C., Willshaw, G.A., Cheasty, T., Domingue, G., 1996. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals. *Vet Rec.* 138, 400.

5 CONCLUSÕES

- Existe correlação positiva entre EPEC e a diarreia em cães.
- As amostras de DEC isoladas apresentaram uma grande variabilidade fenotípica.
- A presença de fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos em amostras de DEC isoladas em nosso estudo representa um perigo para saúde pública.
- Cães e gatos podem servir como reservatórios de DEC para infecções humanas.

ANEXOS

ANEXO A
(Comissão de ética no uso de animais)



**Universidade
Estadual de Londrina**

COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 86/2010

Londrina, 13 de agosto de 2010

Prezado Pesquisador

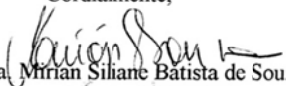
O CEEA/UEL, reunido aos 08 de junho do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Patogenicidade de amostras de *Escherichia coli* diarreiogênicas isoladas de cães e gatos como possíveis fontes de infecção humana**", registrado no CEEA sob o nº 24/10, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está *aprovado* para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 100 animais sendo cães e gatos, 50 machos e 50 fêmeas, de diferentes raças, idades ou pesos. Os animais serão divididos em 4 grupos com 25 animais cada, com procedência de hospitais e clínicas veterinárias da região de Londrina-PR. Os animais serão submetidos a coleta de fezes com uso de swab ou sonda retal para estudo microbiológico, detecção de genes de patogenicidade de *E.coli* diarreiogênica por PCR, determinação do perfil plasmidial, teste de adesão bacteriana em culturas celulares, teste da invasão bacteriana em culturas celulares, determinação de efeitos citotóxicos e citopáticos em culturas celulares, determinação da resistência aos antimicrobianos, sorotipagem e estudo de polimorfismo genético através da técnica de ERIC-PCR e REP-PCR. O projeto está previsto para ser executado entre agosto 2010 e junho de 2012.

Cumprе orientar que caso se pretendam quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação do CEEA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,


Prof. Dra. Mirian Siliane Batista de Souza
Coordenadora do CEEA/UEL

**Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Gerson Nakazato
Coordenador do Projeto
Departamento de Microbiologia
Centro de Ciências Biológicas**