



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MIRIAM DIBO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
ISOLADOS DE *Escherichia coli* DE UM CASO CLÍNICO DE
COLITE HISTIOCÍTICA ULCERATIVA CANINA**

Londrina
2021

MIRIAM DIBO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
ISOLADOS DE *Escherichia coli* DE UM CASO CLÍNICO DE
COLITE HISTIOCÍTICA ULCERATIVA CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

D544c Dibo, Miriam.

Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de Escherichia coli de um caso clínico de colite histiocítica ulcerativa canina / Miriam Dibo. - Londrina, 2021.
44 f. : il.

Orientador: Gerson Nakazato.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Colite granulomatosa - Tese. 2. Multirresistência - Tese. 3. Genes de virulência - Tese. 4. Cães - Tese. I. Nakazato, Gerson. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

MIRIAM DIBO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
ISOLADOS DE *Escherichia coli* DE UM CASO CLÍNICO DE
COLITE HISTIOCÍTICA ULCERATIVA CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr. Juan Josue Puño Sarmiento
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 17 de maio de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Gerson Nakazato, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela confiança em mim depositada. Agradeço por todos os ensinamentos, conselhos e ajuda.

À Prof^a. Dr^a. Renata Kobayashi, que, mesmo não oficialmente, sempre atuou como coorientadora, agradeço pelos ensinamentos, conselhos e ajuda.

Aos membros da banca examinadora, pela disposição e por todas as contribuições a esse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À Prof^a. Dr^a. Fabiana Azevedo Voorwald e seu aluno Gabriel Coutinho Silveira, da Universidade Federal de Viçosa, pela concessão das amostras utilizadas neste estudo e pela disponibilidade em ajudar e esclarecer eventuais dúvidas sobre o caso clínico.

Ao Leo, pelo companheirismo, paciência, carinho, incentivo e por todo o auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do laboratório: Gazal, por todo conhecimento compartilhado no laboratório e pelo auxílio nas etapas finais deste trabalho; e Bruna, pela ajuda e por compartilhar junto comigo dos momentos bons e difíceis deste trabalho.

Aos meus amigos Lucas e Eduardo, pela amizade desde a época da graduação, compartilhando os momentos bons e difíceis da pós-graduação.

À todos os amigos do NIP3 pela companhia e por tornarem a vivência diária no laboratório mais alegre.

Aos meus pais e meu irmão, por todo o apoio e incentivo, não apenas durante a graduação e mestrado, mas em todas as etapas de minha vida. Por sempre estarem presentes, por todo carinho, amor e preocupação.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

DIBO, Miriam. **Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Escherichia coli* de um caso clínico de colite histiocítica ulcerativa canina**. 2021. 44 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A colite histiocítica ulcerativa (CHU) é uma doença inflamatória intestinal que pode acometer principalmente cães jovens das raças Boxer e buldogue francês, sendo associada à presença de *Escherichia coli* Aderente-Invasiva (AIEC). Deste modo, o presente estudo teve como objetivo realizar as caracterizações fenotípica e genotípica de isolados de *E. coli* e sua associação a um CHU em uma fêmea da raça buldogue francês. Neste estudo, foram obtidos 46 isolados de *E. coli*, sendo todos resistentes a ampicilina, ciprofloxacino, enrofloxacino e sulfametoxazoltrimetoprima. Também foram encontradas resistências a amoxicilina-ácido clavulânico, azitromicina, cefazolina, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina. Todos os isolados obtidos foram classificados como multirresistentes e apenas um deles foi positivo no teste fenotípico de produção de beta-lactamases de espectro estendido, pertencendo ao grupo CTX-M-2. Com relação à classificação filogenética de Clermont, a maioria das cepas pertence aos grupos C e B1, enquanto os grupos B2 e F apresentaram apenas um representante cada. Os genes de virulência de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) encontrados foram *ecpA*, *fimH*, *hlyF*, *iroN*, *iss*, *iutA*, *ompT*, *sitA* e *traT*. Nenhuma das cepas apresentou capacidade de replicação no interior de macrófagos J774A.1 em 24 horas, no entanto, três cepas apresentaram capacidade de sobrevivência. A cepa 1.4 apresentou nove genes de virulência de ExPEC, ausência de fatores de virulência de *E. coli* diarreiogênica, e classificação no grupo filogenético B2. Essas características, juntamente com os sintomas apresentados pelo animal, indicam a possibilidade de que infecção por AIEC. No entanto, o teste de sobrevivência e replicação em macrófagos não apresentou resultados conclusivos, sendo necessário realizar os testes fenotípicos de adesão e invasão para confirmação da hipótese.

Palavras-chave: colite granulomatosa; cães; multirresistência; AIEC; genes de virulência.

DIBO, Miriam. **Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from a clinical case of canine histiocytic ulcerative colitis**. 2021. 44 p. Dissertation (Master's degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Histiocytic ulcerative colitis (HUC) is an inflammatory bowel disease that mainly affects young dogs of the Boxer and French Bulldog breeds, being associated with Adherent-Invasive *Escherichia coli* (AIEC) presence. Thus, the present study aimed to perform phenotypic and genotypic characterizations of *E. coli* isolates and their association with a HUC case in a female French Bulldog. In this study, 46 *E. coli* isolates were obtained, all of which are resistant to ampicillin, ciprofloxacin, enrofloxacin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. Resistances to amoxicillin-clavulanic acid, azithromycin, cefazolin, chloramphenicol, gentamicin, and tetracycline were also found. All isolates were classified as multidrug-resistant and only one was positive for extended-spectrum beta-lactamases production in the phenotypic test, belonging to the CTX-M-2 group. Regarding Clermont phylogenetic classification, most strains belong to groups C and B1, while groups B2 and F presented only one representative each. The extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) virulence genes found were *ecpA*, *fimH*, *hlyF*, *iroN*, *iss*, *iutA*, *ompT*, *sitA*, and *traT*. None of the strains were able to replicate within J774A.1 macrophages in 24 hours, however, three strains showed ability to survive. Strain 1.4 showed nine ExPEC virulence genes, absence of diarrheagenic *E. coli* virulence factors, and classification in the B2 phylogenetic group. These characteristics, associated with the animal's symptoms, indicate the possibility of AIEC infection. However, the macrophage survival and replication test did not show conclusive results, being necessary to perform the adhesion and invasion tests to confirm the hypothesis.

Keywords: granulomatous colitis; dogs; multidrug-resistance; AIEC; virulence genes.

LISTA DE ABREVIATURAS

A/E	<i>Attaching and Effacing</i>
AA	Adesão Agregativa
AIEC	<i>E. coli</i> Aderente-Invasiva
AMC	Amoxicilina-Ácido clavulânico
AMK	Amicacina
AMP	Ampicilina
APEC	<i>E. coli</i> Patogênica Aviária
ATM	Aztreonam
AZM	Azitromicina
BHI	Infusão Cérebro-Coração
CAZ	Ceftazidima
CFZ	Cefazolina
CHL	Cloranfenicol
CHU	Colite Histiocítica Ulcerativa
CIP	Ciprofloxacino
CRO	Ceftriaxona
DA	Difuso-Aderente
DAEC	<i>E. coli</i> Difuso-Aderente
DEC	<i>E. coli</i> Diarreiogênica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EAEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva
ENO	Enrofloxacino
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogênica
EPECa	<i>E. coli</i> Enteropatogênica Atípica
EPECt -	<i>E. coli</i> Enteropatogênica Típica
ESBL	Beta-Lactamases de Espectro Estendido
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigênica
ExPEC	<i>E. coli</i> Patogênica Extraintestinal
FEP	cefepima
FISH	Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>

FOX	Cefoxitina
GEN	Gentamicina
GWAS	Estudos de Associação Genômica Ampla
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IPM	Imipenem
LA	Adesão Localizada
LAL	Adesão Localizada-Like
NMEC	<i>E. coli</i> causadora de Meningite Neonatal
PAS	Ácido Periódico-Schiff
PBS	Tampão Salina Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNAr	Ácido Ribonucleico Ribossomal
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SEPEC	<i>E. coli</i> Septicêmica
STEC	<i>E. coli</i> produtora de Toxina Shiga
SXT	Sulfametoxazol-Trimetoprima
T3SS	Sistema de Secreção Tipo 3
TET	Tetraciclina
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UPEC	<i>E. coli</i> Uropatogênica
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1	COLITE HISTIOCÍTICA ULCERATIVA.....	10
2.1.1	Histórico.....	10
2.1.2	Patogênese	12
2.2	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	13
2.2.1	<i>E. coli</i> Diarreiogênica.....	14
2.2.1.1	<i>E. coli</i> enteropatogênica	14
2.2.1.2	<i>E. coli</i> enterotoxigênica.....	15
2.2.1.3	<i>E. coli</i> enteroinvasiva.....	16
2.2.1.4	<i>E. coli</i> enteroagregativa	16
2.2.1.5	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga e <i>E. coli</i> enterohemorrágica	18
2.2.1.6	<i>E. coli</i> aderente-invasiva.....	18
2.2.1.7	<i>E. coli</i> difuso-aderente	19
2.2.2	<i>E. coli</i> Patogênica Extraintestinal	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	DESCRIÇÃO DO CASO CLÍNICO	23
4.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA	23
4.3	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	23
4.4	ANÁLISE DE PRODUÇÃO DE BIOFILME	24
4.5	CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA	24
4.6	IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE DEC.....	24
4.7	IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE EXPEC.....	25
4.8	DETECÇÃO DOS GENES <i>BLACTX-M</i>	25
4.9	SOROTIPAGEM.....	25
4.10	TESTE DE SOBREVIVÊNCIA E REPLICAÇÃO EM MACRÓFAGOS	25

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 INTRODUÇÃO

A colite histiocítica ulcerativa (CHU) é uma doença inflamatória intestinal que acomete principalmente cães das raças Boxer e buldogue francês. Atualmente, essa doença tem sido associada à presença de *Escherichia coli* aderente-invasiva (AIEC), que também está envolvida na patogênese da doença de Crohn em humanos.

Os mecanismos de patogênese da doença ainda não foram totalmente esclarecidos, no entanto, acredita-se que outros fatores também podem estar envolvidos, como desequilíbrios na microbiota intestinal e características genéticas. O tratamento com enrofloxacino geralmente resulta em remissão da doença, no entanto, casos refratários ao tratamento com esse antimicrobiano têm sido relatados, frequentemente resultando em eutanásia.

Até o momento, não foram identificados genes que possam estar diretamente associados às cepas de AIEC. Deste modo, sua identificação normalmente é realizada através de testes fenotípicos, como adesão e invasão à células epiteliais e capacidade de sobrevivência e replicação em macrófagos.

O presente estudo teve como objetivo realizar a identificação fenotípica e genotípica de isolados de *E. coli* e sua associação a um caso de CHU em um buldogue francês. A paciente foi refratária ao tratamento com enrofloxacino e apresentou remissão da doença após tratamento com azitromicina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 COLITE HISTIOCÍTICA ULCERATIVA

A colite histiocítica ulcerativa (CHU), também conhecida como colite granulomatosa, é uma doença inflamatória intestinal que geralmente acomete cães jovens, de ambos os sexos, da raça Boxer (CRAVEN; MANSFIELD; SIMPSON, 2011). No entanto, também já foram relatados casos em animais das raças Buldogue Francês, Mastiff, Malamute do Alasca, Dobermann Pinscher, Beagle e American Staffordshire Terrier (ARGENTA et al., 2018; CARVALLO et al., 2015; STOKES et al., 2001; VAN DER GAAG et al., 1978).

2.1.1 Histórico

A colite granulomatosa foi descrita pela primeira vez em 1965, em um canil nos Estados Unidos, no qual nove cães da raça Boxer foram acometidos, oito deles com idade entre 5 e 18 meses e um de 4 anos. Cães de outras raças que também estavam no mesmo canil não apresentaram a doença (VAN KRUININGEN et al., 1965).

As lesões presentes no intestino dos animais não possuíam semelhança com nenhuma doença inflamatória intestinal canina até então descrita. A análise histológica das lesões indicou presença de macrófagos em grande quantidade nas regiões mucosa e submucosa. Em regiões com lesão grave, havia exposição da submucosa, apresentando lesão granulomatosa composta por macrófagos, neutrófilos, plasmócitos e fibras de colágeno (VAN KRUININGEN et al., 1965).

Através da coloração Ácido Periódico-Schiff (PAS) foi possível observar a presença de polissacarídeos no citoplasma dos macrófagos. A presença de material PAS-positivo no citoplasma de macrófagos é sinal característico da doença de Whipple (CRAVEN; MANSFIELD; SIMPSON, 2011; VAN KRUININGEN et al., 1965). Essa doença sistêmica rara é causada pela bactéria *Tropheryma whipplei*, possui caráter crônico e acomete humanos, causando diarreia, perda de peso, artralgia e linfadenopatia (EL-ABASSI et al., 2017).

A similaridade com a doença de Whipple sugeria a possibilidade de a doença ser causada por um patógeno bacteriano. Através do uso da microscopia

eletrônica, Van Kruiningen (1975) avaliou biópsias das lesões de cães com CHU, sugerindo que o conteúdo eletrondenso presente no citoplasma dos macrófagos poderia representar bactérias do gênero *Mycoplasma*. Gomez et al. (1977) analisaram biópsias de cães com CHU, encontrando macrófagos com conteúdo citoplasmático eletrondenso apenas em regiões em que houve ruptura do epitélio intestinal, sugerindo que os microrganismos presentes seriam patógenos oportunistas.

A infecção de cães da raça Boxer de 8 semanas de idade com *Mycoplasma* não resultou em lesão granulomatosa, descartando a possibilidade desse microrganismo ser o causador da doença (BOWE; VAN KRUININGEN; ROSENDAL, 1982). Portanto, devido à ausência de estudos que confirmassem a presença de um patógeno específico, a doença foi tratada por muito tempo como sendo idiopática e mediada pelo sistema imunológico. Deste modo, os animais acometidos eram tratados com anti-inflamatórios ou imunossupressores em combinação com antibióticos e alterações na dieta, havendo pouco sucesso no tratamento e geralmente resultando em eutanásia (CRAVEN; MANSFIELD; SIMPSON, 2011).

Em 2004, estudos relataram remissão da CHU em cães tratados com enrofloxacino, no entanto, o patógeno responsável pela doença ainda não havia sido identificado (DAVIES et al., 2004; HOSTUTLER et al., 2004). A utilização de técnicas de imunohistoquímica permitiu a identificação de *E. coli* em macrófagos na lâmina própria e submucosa de animais acometidos pela CHU. Também foram identificados, em menor presença, *Campylobacter*, *Lawsonia intracellularis* e *Salmonella* (VAN KRUININGEN; CIVCO; CARTUN, 2005).

Posteriormente, Simpson et al. (2006) identificaram a presença de *E. coli* em amostras de biópsia de cães com CHU utilizando a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e o sequenciamento do RNAr 16S. Essas cepas encontradas apresentavam capacidade de adesão e invasão às células epiteliais, além de possuírem perfil filogenético e genes de virulência semelhantes ao apresentado por *E. coli* aderente-invasiva (AIEC) isolada de um caso de doença de Crohn (SIMPSON et al., 2006). Essa semelhança indicava provável relação entre AIEC e CHU, que foi corroborada por estudos que demonstraram a remissão da doença após a erradicação da bactéria (MANSFIELD et al., 2009; SIMPSON et al., 2006).

2.1.2 Patogênese

Cães acometidos pela CHU apresentam como sintomas diarreia mucóide com pequeno volume, hematoquezia e tenesmo. Alguns animais também podem apresentar anemia e hipoalbuminemia, decorrentes da hematoquezia, e os casos mais graves podem apresentar perda de peso e caquexia. O cólon pode se apresentar, à observação macroscópica, avermelhado, com úlceras que podem variar de pequenas e pontuais à extensas circulares ou lineares com regiões de mucosa superficial remanescente (CRAVEN; MANSFIELD; SIMPSON, 2011; UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016).

As lesões histológicas são caracterizadas por ulcerações na mucosa, perda de células caliciformes e infiltrado de macrófagos na lâmina própria e submucosa, com coloração PAS-positiva, considerado como sinal patognomônico da doença. A presença de infiltrado de macrófagos nos linfonodos adjacentes pode promover hiperplasia e consequente linfadenopatia, que também é encontrada em alguns casos (CRAVEN; MANSFIELD; SIMPSON, 2011; UZAL; PLATTNER; HOSTETTER, 2016).

A CHU apresenta similaridade à doença de Crohn, uma doença inflamatória intestinal causada por AIEC que acomete humanos. A doença de Crohn é decorrente não apenas da infecção por AIEC, mas também por alterações na microbiota intestinal e por predisposições genéticas (CRAVEN; MANSFIELD; SIMPSON, 2011).

Os mecanismos pelos quais AIEC causa doenças inflamatórias intestinais ainda não foram completamente esclarecidos. Sabe-se que a alteração na permeabilidade da barreira epitelial do intestino pode favorecer a infecção por esse patógeno. A interação de AIEC com as células do epitélio intestinal ocorre através da ligação das fímbrias tipo I e LPF com a proteína CEACAM6, cuja expressão é regulada por citocinas pró-inflamatórias, como interferon- γ (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Além disso, a presença dessas citocinas aumenta a permeabilidade do epitélio intestinal, favorecendo a infecção por AIEC (SHAWKI; MCCOLE, 2017).

Mutações no gene *CARD15*, que codifica a proteína NOD2, já foram associadas com o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais. Essa proteína se liga ao peptídeo glicano das bactérias e, em macrófagos, ativa o fator

transcricional NF- κ B e o processo de autólise; nos enterócitos, ativa apenas a autólise, que é um importante mecanismo para eliminação de patógenos intracelulares. A alteração na função da proteína NOD2 pode prejudicar a resposta celular ao patógeno, favorecendo sua sobrevivência nos macrófagos e enterócitos (SHAWKI; MCCOLE, 2017).

O fato de a CHU acometer cães de raças específicas é um indicativo da possibilidade de envolvimento de fatores genéticos, que podem conferir disfunções no sistema imunológico e, conseqüentemente, promover a susceptibilidade do hospedeiro à infecção (CRAVEN; MANSFIELD; SIMPSON, 2011). Desse modo, estudos de associação genômica ampla (GWAS), indicaram associação entre CHU e um polimorfismo no gene que codifica o fator citosólico de neutrófilos 2 (NCF2). Esse gene codifica uma subunidade do complexo NADPH oxidase, responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em fagócitos. A subunidade defectiva prejudica a síntese de ROS e, conseqüentemente a eliminação dos patógenos (CRAVEN et al., 2010a).

2.2 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família Enterobacteriaceae. Apresenta crescimento ótimo a 37°C e algumas características variáveis, como presença de flagelos e capacidade de fermentação da lactose (CROXEN et al., 2013).

Essa bactéria habita o intestino humano e de outros animais de sangue quente, podendo ser comensal ou patogênica. As cepas comensais colonizam o trato gastrointestinal dos animais logo após o nascimento, estabelecendo uma relação mutualística com o hospedeiro (BRAZ; MELCHIOR; MOREIRA, 2020).

As cepas patogênicas podem causar infecções intestinais, sendo denominadas *E. coli* diarreiogênica (DEC), ou extraintestinais, sendo denominadas *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Tanto as cepas de DEC quanto de ExPEC têm sido classificadas em patotipos, definidos a partir de características da infecção, presença de determinados genes e do sítio da infecção (BRAZ; MELCHIOR; MOREIRA, 2020; GOMES et al., 2016).

Atualmente, tem-se constatado o surgimento de cepas híbridas de patotipos de DEC e também de DEC/ExPEC. Esse fenômeno é decorrente da

grande capacidade de troca e aquisição de elementos genéticos móveis, tanto entre bactérias da mesma espécie quanto com outras espécies presentes na microbiota (BRAZ; MELCHIOR; MOREIRA, 2020).

2.2.1 *E. coli* Diarreio gênica

As infecções intestinais causadas por *E. coli* são de grande importância, sendo uma das principais causas de diarreia nos países em desenvolvimento, principalmente em crianças com menos de 5 anos (CROXEN et al., 2013).

As cepas de DEC são classificadas atualmente em 8 patotipos, dos quais 6 são bem descritos na literatura: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Os outros dois patotipos menos descritos são *E. coli* aderente-invasiva (AIEC) e *E. coli* difuso-aderente (DAEC) (GOMES et al., 2016).

2.2.1.1 *E. coli* enteropatogênica

EPEC tem como característica a formação de lesão do tipo *attaching and effacing* (A/E) nos enterócitos, caracterizada pela destruição das microvilosidades e formação de uma estrutura em formato de pedestal, sobre o qual a bactéria permanece aderida. Os genes relacionados com a produção da lesão A/E são codificados por uma ilha de patogenicidade denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE), que codifica o sistema de secreção tipo 3 (T3SS), proteínas efetoras, a proteína intimina e seu receptor Tir (CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016; MAINIL, 2013).

Através do T3SS, as proteínas efetoras são translocadas para o interior da célula hospedeira e realizam alterações na fisiologia da célula, favorecendo a infecção. Além disso, o receptor Tir também é transportado pelo T3SS, e atua na reorganização do citoesqueleto de actina para formação do pedestal e se localiza na superfície do enterócito, onde irá atuar como receptor para a intimina. A intimina é uma proteína transmembrana localizada na membrana externa de EPEC, codificada pelo gene *eae*, que irá se ligar ao Tir para promover a adesão da bactéria à célula (CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016; MAINIL, 2013).

As cepas de EPEC também são subdivididas em típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC), devido à presença ou ausência do plasmídeo EAF, que codifica a fímbria BFP, responsável pela adesão inicial ao epitélio intestinal. A presença de BFP em tEPEC promove adesão do tipo localizada (LA) com formação de microcolônias compactas, enquanto que em aEPEC, devido a sua ausência, as microcolônias não são compactas, sendo denominada “localizada-like” (LAL). No entanto, algumas cepas de aEPEC podem apresentar outros padrões de adesão, como agregativo (AA) ou difuso-aderente (DA) ou em padrão não definido (CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016).

A infecção por EPEC geralmente acomete crianças, sendo rara em adultos, possivelmente devido a um maior desenvolvimento do sistema imunológico ou à perda de receptores específicos de EPEC. Normalmente, em crianças menores de 2 anos, a diarreia também é acompanhada por febre, vômitos e desidratação. Em geral, a infecção é autolimitada, mas em alguns casos a diarreia pode ser persistente, sendo necessária a hospitalização (CROXEN et al., 2013).

Cepas de tEPEC raramente são encontradas em animais, ao contrário de aEPEC, cuja presença já foi relatada tanto em animais com diarreia quanto em animais saudáveis. Os animais domésticos e selvagens podem atuar como reservatório de cepas de aEPEC, o que representaria um possível risco zoonótico, no entanto, essa relação ainda não está bem estabelecida, visto que não há relatos de transmissão direta de animais para humanos (GOMES et al., 2016).

2.2.1.2 *E. coli* enterotoxigênica

ETEC é caracterizada pela presença de fatores de colonização e pela produção de toxinas termolábeis (LT) e/ou termoestáveis (ST). Atualmente, mais de 20 fatores de colonização já foram identificados, que são responsáveis pelo processo de adesão ao epitélio intestinal (FLECKENSTEIN; KUHLMANN, 2019).

As toxinas produzidas por ETEC promovem a desregulação dos canais iônicos do epitélio, ocasionando perda de íons e grande quantidade de água. LT é uma toxina do tipo AB que age aumentando a liberação de íons cloreto e reduzindo a captação de íons sódio, promovendo a saída de água para o lúmen intestinal. Essa toxina apresenta dois subtipos LT-I, cujas variantes são LT_p e LT_h, e LT-II, que possui como variantes LT-II_a, II_b e II_c (CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016).

ST é uma pequena proteína que induz a liberação de íons cloreto e água para o lúmen intestinal e apresenta dois subtipos STa, com as variantes STp e STh, e STb. As variantes de STa são comumente encontradas em isolados de casos humanos, já STb é mais comum em cepas que colonizam animais, principalmente os suínos (FLECKENSTEIN; KUHLMANN, 2019).

A infecção por ETEC tem como característica diarreia aquosa moderada a severa, em alguns casos acompanhada por febre, dor de cabeça, náusea e vômito. Normalmente, acomete crianças e viajantes de países em desenvolvimento (CROXEN et al., 2013). Cepas de ETEC também são responsáveis por diarreia em porcos, bezerros, ovelhas e cães, que geralmente ocorrem no período neonatal ou após o desmame (DUBREUIL; ISAACSON; SCHIFFERLI, 2016).

2.2.1.3 *E. coli* enteroinvasiva

EIEC é um patógeno que apresenta similaridades com espécies de *Shigella*, como características bioquímicas e o processo de infecção. As características bioquímicas comuns entre EIEC e *Shigella* são a ausência de motilidade, lisina descarboxilase negativa e fermentação lenta ou não fermentação da lactose (GOMES et al., 2016). Além disso, assim como *Shigella* spp, EIEC apresenta o plasmídeo pINV, que codifica genes responsáveis pela invasão e capacidade de sobrevivência no epitélio intestinal (BELOTSEKOVSKY; SANSONETTI, 2018).

A infecção por EIEC se inicia com a invasão do epitélio intestinal a partir das células M por transcitose. Na lâmina própria, as bactérias são fagocitadas por macrófagos e, através de mecanismos de evasão, escapam dessas células e ficam livres para invadir os enterócitos em sua região baso-lateral. Sua replicação ocorre dentro dos enterócitos e a disseminação ocorre célula a célula, lateralmente (CROXEN et al., 2013).

Normalmente, a diarreia por EIEC é aquosa, semelhante à de ETEC, no entanto, alguns casos podem apresentar sintomas mais graves, como diarreia com muco e sangue, cólicas abdominais, tenesmo e febre (KAPER; NATARO, 1998).

2.2.1.4 *E. coli* enteroagregativa

EAEC é caracterizada pela presença de padrão de adesão agregativo em culturas de células. No entanto, algumas cepas de outros patótipos,

como aEPEC, também podem apresentar o padrão AA. Deste modo, uma melhor definição para EAEC seria a presença de padrão AA juntamente com a ausência de outros marcadores que definem os demais patótipos de DEC (GOMES et al., 2016).

As cepas de EAEC podem ser divididas em dois subgrupos, definidos pela presença ou ausência do gene *aggR*, sendo denominadas típica ou atípica, respectivamente. O gene *aggR* codifica o fator de transcrição AggR, responsável pela regulação da síntese de adesina fimbrial (AAF) (JENKINS, 2018). A maioria dos genes de fatores de virulência de EAEC estão contidos em um plasmídeo, denominado pAA (CROXEN et al., 2013).

O processo de infecção por EAEC pode ser dividido em três etapas: adesão à mucosa intestinal, produção de toxinas e inflamação da mucosa. A adesão ao epitélio intestinal está associada com a presença de adesinas fimbriais (AAF) e afimbriais. Essa etapa também é caracterizada pelo aumento da produção de muco pelo epitélio intestinal, promovendo a formação de biofilme pelas bactérias (GOMES et al., 2016).

A próxima etapa é caracterizada pela produção de toxinas, sendo EAST-1, ShET1, Pic e Pet as mais estudadas. EAST-1 é uma toxina termo-estável, ShET1 promove acúmulo de fluidos no lúmen, Pic tem atividade de mucinase e Pet promove alterações no citoesqueleto. A colonização do intestino por EAEC e a resposta imune do hospedeiro promovem inflamação do epitélio (ESTRADA-GARCIA; NAVARRO-GARCIA, 2012).

A infecção por EAEC acomete tanto adultos quanto crianças, de países desenvolvidos ou em desenvolvimento, e tem como característica a presença de diarreia aquosa, com presença de muco, acompanhada por febre baixa e dores abdominais. Alguns casos podem apresentar diarreia persistente, principalmente em crianças e pacientes infectados por HIV (CROXEN et al., 2013; LIMA; MEDEIROS; HAVT, 2018). Em crianças, a diarreia persistente pode levar à inflamação crônica no intestino e conseqüente dano ao epitélio, reduzindo a capacidade de absorção de nutrientes e podendo ocasionar atraso intelectual e no crescimento (GUERRANT et al., 2008).

Cepas de EAEC já foram isoladas de animais, no entanto, nenhuma apresentou relação com cepas isoladas de humanos, indicando que os animais não são reservatório importante de cepas patogênicas de EAEC. Apesar disso, devido à

alta heterogeneidade apresentada por cepas de EAEC, a hipótese de transmissão zoonótica ainda não deve ser descartada (CROXEN et al., 2013).

2.2.1.5 *E. coli* produtora de toxina Shiga e *E. coli* enterohemorrágica

A presença do gene que codifica a produção de toxina Shiga é o que caracteriza cepas de STEC. A toxina Shiga é uma toxina do tipo AB, codificada por um gene profágico, que pode ser dividida em dois tipos Stx1 e Stx2, que apresentam 3 (a, c e d) e 7 (a-g) subtipos, respectivamente. EHEC é um subtipo de STEC caracterizado pela presença da ilha de patogenicidade LEE e produção de lesão A/E (CROXEN et al., 2013).

O mecanismo pelo qual a toxina Shiga atravessa o epitélio intestinal e penetra na corrente sanguínea ainda não foi bem esclarecido (CROXEN et al., 2013). Sabe-se que, na corrente sanguínea, a toxina Shiga se liga aos receptores Gb3 presentes na superfície do endotélio, que promove sua internalização para o retículo endoplasmático, onde a subunidade A sofre clivagem e ativação, sendo liberada para o citoplasma. No citoplasma, a subunidade ativa se liga ao RNAr 28S e remove um resíduo de adenina, impedindo a síntese proteica e ocasionando morte celular (MAINIL, 2013).

As infecções por STEC/EHEC são caracterizadas por diarreia sanguinolenta e, em alguns casos, desenvolvimento de síndrome hemolítico-urêmica. Os casos mais graves geralmente são associados ao sorotipo O157:H7, no entanto, outros sorotipos não-O157 também apresentam importância clínica (CROXEN et al., 2013; GOMES et al., 2016).

Água e alimentos contaminados são importantes veículos de transmissão, sendo responsáveis por surtos esporádicos em diversos países (CROXEN et al., 2013). A presença de cepas de STEC/EHEC em animais já foi relatada, sendo o gado o principal reservatório (NGUYEN; SPERANDIO, 2012).

2.2.1.6 *E. coli* aderente-invasiva

Cepas de AIEC têm como características a habilidade de aderir e invadir o epitélio intestinal, e capacidade de sobreviver e se replicar em macrófagos. Esse patotipo apresenta alta similaridade com ExPEC, sendo encontrados em AIEC genes de virulência comuns à cepas de *E. coli* causadoras de infecção do trato urinário e meningite neonatal. Além disso, grande parte das cepas de AIEC são

pertencentes ao grupo filogenético B2, no qual as ExPEC também são inseridas. Além disso, não apresenta genes de virulência de adesão e invasão encontrados em outros patótipos de DEC (CROXEN et al., 2013; PALMELA et al., 2018).

A identificação de cepas de AIEC é feita por testes fenotípicos de invasão à células epiteliais e sobrevivência em macrófagos, pois até o momento um gene associado diretamente a esse patótipo ainda não foi identificado (CROXEN et al., 2013).

Infecções por AIEC são encontradas em diversos grupos, em indivíduos adultos e crianças, saudáveis ou com doenças inflamatórias intestinais, como câncer colorretal e doença de Crohn. Essas cepas também são encontradas em infecções em animais, como a CHU em cães (MARTINEZ-MEDINA; GARCIA-GIL, 2014; PALMELA et al., 2018).

A relação entre AIEC e o surgimento da doença inflamatória intestinal ainda não está totalmente esclarecida, deste modo, não se sabe se o processo inflamatório é decorrente da infecção por AIEC ou se a infecção por AIEC ocorre em decorrência de um processo inflamatório prévio (CROXEN et al., 2013; PALMELA et al., 2018).

2.2.1.7 *E. coli* difuso-aderente

Cepas de DAEC são caracterizadas pelo padrão difuso-aderente em cultura de células, no qual a adesão ocorre espalhada em toda a superfície celular. O processo de adesão ao epitélio é mediado por adesinas fimbriais (Afa) e afimbriais (Dr), que se ligam ao fator DAF, responsável pelo rearranjo do citoesqueleto e a destruição das microvilosidades. Algumas dessas adesinas também se ligam ao receptor CEACAM, que promove a internalização dessas bactérias em vacúolos (CROXEN et al., 2013). Além disso, algumas adesinas afimbriais são capazes de se ligar ao colágeno tipo IV (LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006).

Há poucas informações sobre a epidemiologia deste patótipo, no entanto, sabe-se que acomete principalmente crianças, com risco maior no período de 18 meses até 5 anos, que apresentam diarreia aquosa persistente (CROXEN et al., 2013). Estudos sugerem que a presença de cepas de DAEC em crianças e adultos de forma persistente pode favorecer o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais crônicas, como a doença de Crohn (LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006).

Já foram encontradas associações deste patotipo com infecções do trato urinário. Acredita-se que processo de internalização promovido pelas adesinas pode favorecer a formação de um reservatório de bactérias para a recorrência da infecção (LE BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006).

2.2.2 *E. coli* Patogênica Extraintestinal

Cepas de ExPEC são assim classificadas devido à capacidade de causar infecções em sítios extraintestinais, no entanto, podem residir no intestino como parte da microbiota, sem causar dano ao hospedeiro (WASIŃSKY, 2019). Os patotipos são definidos de acordo com o hospedeiro acometido e local da infecção, sendo eles *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* septicêmica (SEPEC), *E. coli* causadora de meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* patogênica aviária (APEC) (MELLATA, 2013).

Infecções por *E. coli* uropatogênica (UPEC) são as mais comuns causadas por ExPEC. Acomete indivíduos adultos saudáveis, com maior prevalência em mulheres, além disso, o uso de cateter também é um risco associado à infecção por UPEC (BIRAN; RON, 2018; MELLATA, 2013).

Infecções por SEPEC representam cerca de 30% de todos os casos de sepse, apresentando alta taxa de morbidade e mortalidade. Essas infecções podem acometer idosos, indivíduos imunossuprimidos e neonatos. Devido ao baixo desenvolvimento do sistema imunológico, neonatos também estão susceptíveis a infecções por NMEC, que apresentam alta taxa de mortalidade (BIRAN; RON, 2018; MELLATA, 2013).

APEC é responsável por grandes perdas econômicas na avicultura, devido a sua alta taxa de morbidade e mortalidade. As infecções causadas por esse patotipo podem ser sistêmicas, como a colibacilose, ou locais, como celulite e salpingite (MELLATA, 2013; WASIŃSKY, 2019).

Geralmente, cepas de ExPEC são classificadas nos grupos filogenéticos B2 e D, sendo as cepas de B2 normalmente mais virulentas (MELLATA, 2013). Os fatores de virulência expressos por ExPEC permitem a colonização de diferentes sítios, dentre eles estão adesinas, sistemas de captação de ferro, protectinas, invasinas e toxinas. A detecção de alguns genes é utilizada para identificação desses fatores de virulência, como *ecpA*, *fimH*, *papC* e *papG* para adesinas; *chuA*, *fyuA*, *iroN* e *iutA* para sistemas de captação de ferro; *iss*, *kpsMT II* e

traT para protectinas; *ibeA* para invasinas; e *cnf*, *hlyA* e *tsh* para toxinas, dentre outros (JOHNSON; RUSSO, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fenotípica e genotipicamente isolados de *E. coli* de um caso de colite histiocítica ulcerativa canina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar colônias de *E. coli* de um caso de colite histiocítica ulcerativa canina.

Realizar caracterização fenotípica dos isolados através da determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, produção de biofilme e sobrevivência e replicação em macrófagos.

Realizar caracterização genotípica dos isolados através da determinação do grupo filogenético e busca de genes de virulência de DEC e ExPEC.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DO CASO CLÍNICO

Uma fêmea canina de 18 meses da raça Buldogue Francês foi atendida no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa em novembro de 2018. Apresentou histórico de diarreia crônica mucosa, hematoquezia, tenesmo e pequeno prolapso retal por 5 meses. Inicialmente, foi realizado tratamento com sulfasalazina, metronidazol, prednisona e sulfametoxazol-trimetoprima, no entanto, a paciente não apresentou melhora.

A análise histopatológica da biópsia realizada durante a colonoscopia confirmou o diagnóstico de CHU e a paciente foi tratada com enrofloxacino e prednisolona, além de modificação na dieta. O tratamento não foi efetivo, sendo suspensa a prednisolona e incluído metronidazol e amoxicilina-ácido clavulânico juntamente à enrofloxacino por 8 semanas.

Não houve melhora com o tratamento, e a paciente apresentou perda de peso e piora no quadro de hematoquezia. Deste modo, uma nova colonoscopia foi realizada para realização de cultura e antibiograma, além de prescrição de amicacina e transplante de microbiota fecal, também sem sucesso.

O resultado do antibiograma apontou sensibilidade a azitromicina, que foi prescrita em tratamento de 8 semanas. A paciente começou a apresentar melhora após 7 dias de tratamento e, ao final das 8 semanas, uma nova colonoscopia foi realizada, na qual a mucosa apresentou aspecto normal, também confirmada pelo histopatológico.

4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

As colônias foram isoladas de placas de ágar nutriente (HiMedia®) e ágar MacConkey (HiMedia®) e submetidas à identificação bioquímica, utilizando os meios EPM, MILi e Citrato de Simmons (Enterokit B, Probac®). Os isolados identificados como *Escherichia coli* foram estocadas em caldo infusão cérebro-coração (BHI) (Acumedia®) suplementado com 40% de glicerol (Merck®).

4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A sensibilidade aos antimicrobianos foi testada seguindo a metodologia de disco-difusão em ágar do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008, 2018). A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade para o teste. Os antimicrobianos testados foram: amicacina (AMK – 30 µg), ampicilina (AMP – 10 µg), azitromicina (AZM – 30 µg), cefazolina (CFZ – 30 µg), cefoxitina (FOX – 30 µg), ciprofloxacino (CIP – 5 µg), cloranfenicol (CHL – 30 µg), enrofloxacino (ENO – 5 µg), gentamicina (GEN – 10 µg), imipenem (IPM – 10 µg), sulfametoxazol-trimetoprima (SXT – 25 µg), e tetraciclina (TET – 30 µg).

Para o teste de identificação de bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), foram utilizados os seguintes antimicrobianos: amoxicilina-ácido clavulânico (AMC – 30 µg), aztreonam (ATM – 30 µg), cefepima (FEP – 30 µg), ceftazidima (CAZ – 30 µg) e ceftriaxona (CRO – 30 µg).

4.4 ANÁLISE DE PRODUÇÃO DE BIOFILME

A análise da produção de biofilme pelos isolados foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Wakimoto et al. (2004). Foram utilizadas microplacas de 96 poços contendo, em cada poço, 195 µL de DMEM suplementado com 0,45% de glicose (Synth®) e 5 µL de cultura bacteriana previamente crescida. Após incubação por 18 horas a 37°C, o conteúdo dos poços foi lavado com PBS, corado com cristal violeta 0,5% e solubilizado com etanol absoluto, para leitura em espectrofotômetro a 570 nm. As cepas *E. coli* HB101 e EAEC 042 foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente.

4.5 CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA

A classificação filogenética dos isolados foi realizada de acordo com Clermont et al. (2013), que classifica cepas de *E. coli* em sete filogrupos: A, B1, B2, C, D, E ou F. Essa classificação é realizada através da identificação dos genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TspE4.C2.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE DEC

Para identificação dos genes de virulência de DEC, foi realizada PCR para os seguintes genes: *eae*, *bfpA*, *elt*, *ipaH* (ARANDA et al., 2007), *stx1*, *stx2*, *hlyA* (PATON; PATON, 1998), *aggR* (CERNA; NATARO; ESTRADA-GARCIA, 2003), ST Ia e ST Ib (SCHULTSZ et al., 1994).

4.7 IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE EXPEC

Para identificação dos genes de virulência de ExPEC, foi realizada PCR para os seguintes genes: *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss*, *iutA* (JOHNSON et al., 2008), *tsh* (DOZOIS et al., 2000), *papC* (LE BOUGUENEC; ARCHAMBAUD; LABIGNE, 1992), *ecpA* (BLACKBURN et al., 2009), *hlyA*, *cnf-1* (YAMAMOTO et al., 1995), *cnf-2* (BLANCO et al., 1996), *fimH*, *papG*, *ibeA*, *fyuA*, *sitA*, *traT* e *kpsMT II* (JOHNSON; STELL, 2000).

4.8 DETECÇÃO DOS GENES *BLA*_{CTX-M}

Os isolados que apresentaram característica fenotípica de ESBL no teste de sensibilidade aos antimicrobianos foram submetidos à identificação dos grupos CTX-M. A detecção foi realizada por PCR para identificação dos seguintes genes: *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-9} e *bla*_{CTX-M-25} (PITOUT et al. 2007).

4.9 SOROTIPAGEM

A sorotipagem dos isolados foi realizada pelo Prof. Dr. Armando Navarro, da Universidad Nacional Autónoma de México, por reação de aglutinação com soro de coelho. Foram testados 188 antígenos somáticos (O) e 53 flagelares (H).

4.10 TESTE DE SOBREVIVÊNCIA E REPLICAÇÃO EM MACRÓFAGOS

O teste de sobrevivência e replicação em macrófagos foi realizado em células da linhagem J774A.1, seguindo a metodologia de Glasser et al. (2001) com modificações. As cepas *E. coli* DH5- α e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium UK-1 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente.

Os macrófagos foram cultivados em placas de 24 poços até confluência acima de 90%. As placas foram lavadas com PBS e foi adicionado 1 mL de RPMI (LGC Biotecnologia®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®) e o inóculo com concentração final de $1,5 \cdot 10^7$ UFC/mL, seguido por incubação a 37°C, 5% CO₂, por uma hora. Após a incubação, as placas foram lavadas com PBS e foi adicionado 1 mL de RPMI suplementado com soro fetal

bovino (10%) e amicacina (200 µg/mL), seguido por incubação a 37°C, 5% CO₂, por 2 horas.

As placas foram lavadas com PBS e foi adicionado 1 mL de RPMI suplementado com soro fetal bovino (10%) e amicacina (20 µg/mL), seguido por incubação a 37°C, 5% CO₂. A lise das células foi realizada nos tempos 2 e 24 horas, com a contagem iniciada na etapa de adição de RPMI contendo 200 µg/mL de amicacina.

A lise foi realizada, após a lavagem da placa com PBS, pela adição de 1 mL de Triton X-100 (0,1%) em cada poço, seguida por plaqueamento em ágar MacConkey (HiMedia®) e incubação à 37°C por 18 horas, para contagem de UFC/mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas, no total, 46 colônias com perfil fenotípico de *E. coli*, sendo 34 provenientes de ágar MacConkey e 12 de ágar nutriente. Com relação ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos, todos os isolados (100%) apresentaram resistência a AMP, CIP, ENO e SXT, 44 a CHL (95,65%), 31 a TET e GEN (67,39%), 11 a AZM (23,91%), 6 a CFZ (13,04%) e 2 a AMC (4,34%) (Tabela 1). Não foram encontradas cepas resistentes a AMK, ATM, CAZ, CRO, FEP, FOX e IPM.

Geralmente, casos de CHU em cães são tratados com a administração de ENO, que tem apresentado boa responsividade e remissão da doença (MANCHESTER et al., 2013; MANSFIELD et al., 2009). No entanto, já foram relatados casos de animais não responsivos a tratamento com fluorquinolonas, em alguns sendo necessário eutanásia (CRAVEN et al., 2010b; LUCENA; NOVALES; GINEL, 2017; MANSFIELD et al., 2009).

Craven et al. (2010b) analisaram o perfil de resistência de *E. coli* isoladas de casos refratários e verificaram presença de cepas resistentes a fluorquinolonas, sugerindo a possibilidade de aquisição da resistência devido ao tratamento prévio com ENO. Além disso, observaram alta frequência de resistência a CHL, presente em 50% das cepas resistentes a fluorquinolonas. O presente trabalho apresenta dados em concordância, visto que o tratamento com ENO foi realizado previamente à biópsia e a resistência a fluorquinolonas também foi observada. Do mesmo modo, foi verificada resistência a SXT, que também foi utilizada previamente para tratamento da paciente. Alta frequência de resistência a CHL também foi observada (84,78%).

Para que o tratamento possa ser efetivo, deve-se levar em conta a capacidade do antimicrobiano de penetrar nas células do hospedeiro, visto que a replicação de AIEC ocorre no interior dos macrófagos. Estudos feitos por Subramanian et al. (2008) avaliaram a eficácia de alguns antimicrobianos na eliminação de *E. coli* em macrófagos J774A.1, verificando que azitromicina, ciprofloxacino, claritromicina, rifampicina, sulfametoxazol, tetraciclina e trimetoprima apresentaram boa atividade, enquanto que ampicilina e aminoglicosídeos não apresentaram eficácia significativa.

Apesar da sensibilidade dos isolados à AMK demonstrada no teste de disco-difusão em ágar, a utilização deste antimicrobiano para o tratamento da paciente não apresentou resposta positiva. Este fato pode estar relacionado com a efetividade na eliminação de bactérias intracelulares, visto que esse antimicrobiano apresenta baixa capacidade de penetração em células de mamíferos. Do mesmo modo, a baixa resistência a AZM apresentada pelos isolados e sua capacidade de penetrar macrófagos podem ter contribuído para o sucesso do tratamento.

Dentre os isolados, 7 apresentaram resistência a 7 classes de antimicrobianos (15,22%), 22 apresentaram resistência a 6 classes (47,83%), 6 apresentaram resistência a 5 classes (13,04%) e 11 apresentaram resistência a 4 classes (23,91%) (Tabela 1). Deste modo, de acordo com a definição proposta por Magiorakos et al. (2012), todos os isolados obtidos podem ser classificados como multirresistentes (MDR). Alguns estudos também isolaram *E. coli* MDR de cães diagnosticados com CHU resistentes ao tratamento com ENO (LUCENA; NOVALES; GINEL, 2017; MANCHESTER et al., 2020; MUELLER et al., 2016).

Apenas um isolado (2,17%) foi positivo no teste fenotípico de ESBL (Cepa 1.4), pertencendo ao grupo CTX-M-2. A presença de cepas de *E. coli* com características de ESBL isoladas de CHU também foi relatada por Mueller et al. (2016), no entanto, a identificação do gene envolvido não foi realizada.

Estudos epidemiológicos mostram que o grupo CTX-M-2 ainda é o mais frequentemente isolado no Brasil e na América do Sul (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017; SILVA; LINCOPAN; 2012), no entanto, não foram encontrados dados sobre a prevalência dos genes *bla*_{CTX-M} em animais de companhia no Brasil. A presença de cepas de ESBL tem grande importância na clínica, pois está associada à necessidade do uso de carbapenêmicos, que atualmente são utilizados para tratamento de infecções graves. O aumento no uso dessa classe de antimicrobianos pode desencadear a disseminação de cepas resistentes ao tratamento com carbapenêmicos (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017).

Nenhuma das cepas apresentou produção de biofilme (Tabela 1), diferentemente do relatado na literatura. Martinez-Medina et al. (2009a) compararam a capacidade de produção de biofilme por cepas de AIEC e não-AIEC, observando maior frequência de produção de biofilme nas cepas de AIEC, que eram em maioria, produtoras moderadas.

Com relação à classificação filogenética, a maioria das cepas foi pertencente ao grupo C (29 cepas, 63,04%), seguido pelo grupo B1 (15 cepas, 32,6%) e os grupos B2 e F apresentaram apenas um representante cada (2,17%), sendo elas 1.4 e 1.2, respectivamente (Tabela 1).

Estudos realizados com *E. coli* isolada de CHU identificaram, em maioria, cepas pertencentes ao grupo filogenético B2, no entanto, também foram encontradas cepas dos grupos A, B1 e D (ARGENTA et al., 2018; MANCHESTER et al., 2020; SIMPSON et al., 2006). Esses dados são diferentes dos encontrados no presente trabalho, que verificou a presença de apenas uma cepa pertencente ao grupo B2.

A distribuição dos grupos filogenéticos pode variar de humanos para animais, sendo verificada a presença de cepas A e B2 com maior frequência em humanos e B1 em animais (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012; TENAILLON et al., 2010). Cepas pertencentes ao filogrupo B1 se destacaram como o segundo grupo mais frequentemente isolado no presente estudo.

A classificação filogenética apresentada pelos estudos citados acima foi feita utilizando a metodologia proposta por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000), que se baseava na detecção de dois genes (*chuA* e *yjaA*) e um fragmento de DNA (TspE4.C2) para classificação em quatro filogrupos (A, B1, B2 e D). No entanto, a nova classificação proposta por Clermont et al. (2013), que foi utilizada neste trabalho, incluiu o gene *arpA*, modificando principalmente a classificação nos grupos A e D. Deste modo, não é possível fazer uma comparação precisa entre os estudos citados e o presente trabalho, em decorrência das modificações na classificação dos grupos filogenéticos.

A identificação de fatores de virulência de DEC mostrou que 14 cepas foram positivas para o gene *ipaH* e não houve presença dos demais genes testados. Todas as cepas positivas para o gene *ipaH* pertencem ao grupo filogenético B1.

A presença do gene *ipaH* é sugestiva para infecção por cepas de EIEC, no entanto, relatos de infecção por EIEC em cães não são comumente encontrados, sendo, em maioria, relatados em humanos e primatas (CROXEN et al., 2013). Além disso, as 14 cepas positivas para o gene *ipaH* não apresentam o perfil bioquímico característico de EIEC descrito na literatura (CROXEN et al., 2013; GOMES et al. 2016), sendo todas positivas para fermentação de lactose e presença

de lisina descarboxilase e uma apresentou motilidade positiva. Deste modo, devido ao fato de as características bioquímicas serem conflitantes com o perfil genotípico para a classificação dessas cepas como EIEC, é necessário realizar o teste fenotípico de invasão e o sequenciamento do fragmento obtido na PCR para o gene *ipaH*, visando confirmar a presença ou não deste gene.

Diferentemente de EIEC, cepas de AIEC normalmente não apresentam fatores de virulência de DEC e estudos realizados com AIEC isoladas de cães com CHU não indicaram a presença destes genes (ARGENTA et al., 2018; SIMPSON et al., 2006). Deste modo, a possibilidade de infecção por AIEC neste caso ainda pode ser considerada.

Quanto à presença de genes de virulência de ExPEC, todas as cepas foram positivas para o gene *fimH* (100%), 45 foram positivas para *ecpA* (97,82%), 30 foram positivas para *traT* (65,21%), duas foram positivas para *sitA* (4,34%) e apenas uma foi positiva para os genes *hlyF*, *iroN*, *iss*, *iutA* e *ompT* (2,17%).

Apenas as cepas 1.2 e 1.4 apresentaram o gene *sitA* e somente a cepa 1.4 foi positiva para os genes *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss* e *iutA*. Com exceção da cepa 1.2, todas as demais foram positivas para o gene *ecpA* (Tabela 1). Nenhuma das cepas apresentou os genes *cnf-1*, *cnf-2*, *fyuA*, *hlyA*, *ibeA*, *kpsMT II*, *papC*, *papG* e *tsh*.

Como descrito por Palmela et al. (2018), cepas de AIEC apresentam maior similaridade genética com ExPEC, apresentando fatores de virulência associados a UPEC, APEC e NMEC. Devido a ausência de um marcador genético específico para esse patótipo, estudos têm identificado genes de ExPEC nos isolados de AIEC, como *chuA*, *fimH*, *fyuA*, *hlyA*, *ibeA*, *iroN*, *iss*, *kpsMT II*, *lpfA*, *ompT*, *papC*, *sitA* e *traT*, dentre outros (ARGENTA et al., 2018; DOGAN et al., 2014, 2020; MARTINEZ-MEDINA et al., 2009c; SIMPSON et al., 2006).

Argenta et al. (2018) e Simpson et al. (2006) também realizaram a detecção dos genes *iroN*, *iss*, *iutA*, *hlyF* e *ompT* em cepas de AIEC isoladas de cães com CHU, relatando a presença de 2 (*iroN* e *iss*) e 3 (*iroN*, *iss* e *ompT*) genes, respectivamente. No presente trabalho, os cinco genes foram encontrados em uma única cepa (1.4). A alta frequência de cepas positivas para o gene *ecpA* era esperada, visto que a adesina por ela codificada (ECP) é comum tanto em cepas patogênicas quanto comensais, podendo estar presente em cerca de 96% das cepas de *E. coli* (RENDÓN et al., 2007).

Do mesmo modo, a presença do gene *fimH* em um grande número de cepas era esperada, visto que a proteína por ele codificada (FimH) é uma das subunidades que compõem a fímbria tipo I. Essa fímbria é amplamente encontrada em cepas de *E. coli* e considerada um importante fator de virulência em cepas de ExPEC, principalmente em UPEC (MYDOCK-MCGRANE; HANNAN; JANETKA, 2017; SCHEMBRI et al., 2001). Além disso, sua importância na patogenia de doenças inflamatórias intestinais causadas por AIEC também já foi estabelecida (SHAWKI; MCCOLE, 2017). Devido ao seu papel fundamental no estabelecimento dessas infecções, alguns estudos já propõem o desenvolvimento de terapias utilizando esse fator de virulência como alvo (MYDOCK-MCGRANE; HANNAN; JANETKA, 2017; SARSHAR et al., 2020; SIVIGNON et al., 2017).

A presença de genes envolvidos com adesinas (*ecpA* e *fimH*), captação de ferro (*iroN*, *iutA* e *sitA*), resistência sérica (*iss* e *traT*), proteases de membrana (*ompT*) e produção de toxinas (*hlyF*), pode favorecer a sobrevivência da bactéria e conseqüentemente o estabelecimento da infecção.

Foram selecionadas sete cepas para sorotipagem, com base em seu perfil de resistência, sendo elas 1.4, 3.4, 4.1, 5.2, 6.2, 6.5 e 7.1. Os sorotipos encontrados foram O20:H4 na cepa 1.4, O132:HNM nas cepas 5.2 e 6.2, ONT:HNM nas demais cepas.

Os sorotipos identificados neste estudo não são característicos de nenhum dos patótipos de *E. coli* descritos (CROXEN et al., 2013). Além disso, estudos que realizaram sorotipagem de cepas de AIEC isoladas de CHU não obtiveram sorotipos semelhantes aos deste trabalho (DOGAN et al., 2020; MANCHESTER et al., 2020; SIMPSON et al., 2006). Esse fato pode ocorrer devido à alta diversidade de sorotipos apresentada por cepas de AIEC (MARTINEZ-MEDINA; GARCIA-GIL, 2014).

O teste de sobrevivência e replicação em macrófagos foi realizado com as sete cepas que foram selecionadas para sorotipagem. Somente o controle positivo apresentou aumento na contagem de UFC no tempo 24 horas, com o aumento de 1 Log em comparação ao tempo 2 horas. A contagem de UFC das cepas 1.4, 5.2 e 6.2 permaneceu no mesmo Log nos dois tempos analisados, sendo que a cepa 5.2 apresentou contagem de UFC igual nos dois tempos ($2,8 \cdot 10^4$). As

demais cepas apresentaram redução de 1 Log e o controle negativo não foi capaz de sobreviver no período analisado (Figura 1).

Figura 1 - Teste de sobrevivência e replicação em macrófagos

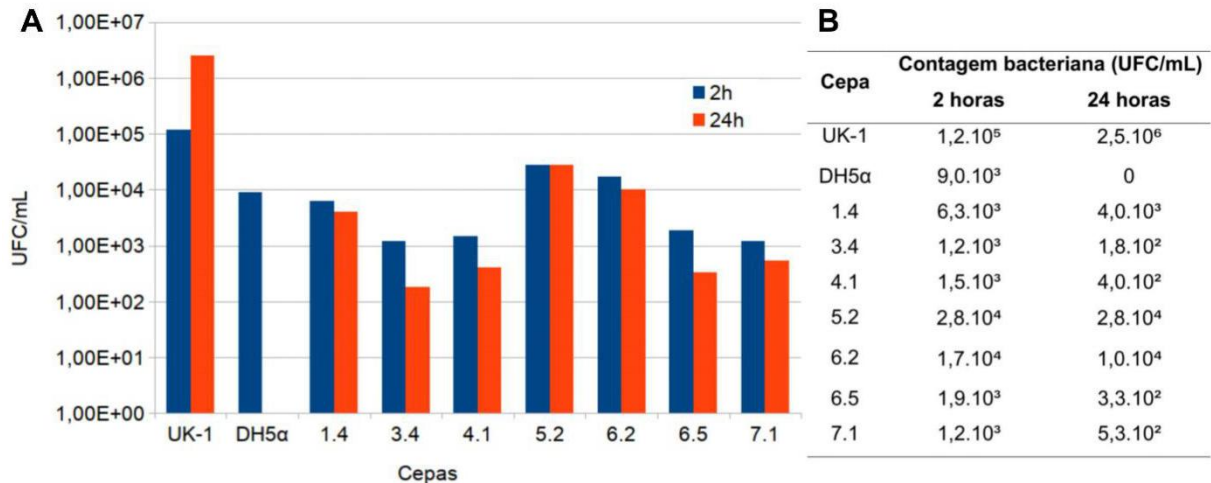


Figura 1. A: Gráfico da contagem de UFC/mL das cepas testadas nos tempos 2 e 24 horas. B: Tabela com a contagem bacteriana de cada cepa nos tempos 2 e 24 horas.

As cepas testadas no presente estudo apresentaram menor capacidade de sobrevivência quando comparadas com estudos relatados na literatura. Glasser et al. (2001) avaliaram a capacidade de sobrevivência e replicação em macrófagos J774A.1 de 15 cepas de AIEC. Os resultados foram expressos na forma de porcentagem de sobrevivência, calculada para cada tempo considerando a contagem bacteriana do tempo 2 horas como 100%. Nesse estudo, verificaram que todas as cepas foram capazes de se replicar em um período de até 48 horas, sendo que no tempo 24 horas todas já apresentavam porcentagem de sobrevivência superior a 100%. Considerando que o presente estudo avaliou a sobrevivência das cepas em apenas um intervalo de tempo, não é possível fazer uma comparação precisa com os resultados observados por Glasser et al. (2001).

Martinez-Medina et al. (2009b) utilizaram a porcentagem de sobrevivência das cepas em 24 horas para classificá-las como capazes de sobreviver (% de sobrevivência \geq 100%) ou de se replicar (% de sobrevivência \geq 200%) no interior dos macrófagos. Ao utilizar essa forma de classificação, somente a cepa 5.2 poderia ser considerada capaz de sobreviver e nenhuma capaz de se replicar. Entretanto, considerar porcentagens em valores altos (exponenciais ou log)

não seria a melhor forma de comparar a sobrevivência, uma vez que, todas as cepas apresentaram valores de UFC/mL próximos do tempo 2 horas, demonstrando uma considerável sobrevivência apesar de a porcentagem não ser elevada.

Os resultados da sobrevivência no tempo 48 horas seriam de grande importância para o presente trabalho, permitindo uma melhor visualização da taxa de replicação ou redução da sobrevivência. No entanto, sua realização não foi possível, devido à dificuldades no cultivo e manutenção da cultura celular.

Deve-se ressaltar que a classificação de uma cepa como AIEC depende não somente do resultado da capacidade de sobrevivência e replicação em macrófagos, mas também dos resultados de adesão e e invasão à células epiteliais, que não foram realizados nesse estudo. Deste modo, não é possível concluir se as cepas analisadas neste trabalho podem ser classificadas como AIEC. A ausência de um perfil genotípico preciso para a classificação de uma cepa como AIEC dificulta sua detecção, sendo necessária a realização dos testes fenotípicos para essa finalidade.

Com relação à cepa 1.4, a presença de 9 genes de fatores de virulência de ExPEC (*ecpA*, *fimH*, *iroN*, *iss*, *iutA*, *hlyF*, *ompT*, *sitA* e *traT*), a ausência de fatores de virulência de DEC, sua classificação no grupo filogenético B2 e os sintomas apresentados pela paciente indicam a possibilidade de que ela seja aderente-invasiva e a causadora da doença. No entanto, os resultados obtidos no teste de sobrevivência e replicação em macrófagos não foram conclusivos, sendo necessário realizar os testes fenotípicos de adesão e invasão para confirmação da hipótese, visto que já foi relatada a presença de cepas de *E. coli* com genes de ExPEC no intestino de animais de companhia (JOHNSON; STELL; DELAVARI, 2001).

Tabela 1 - Relação dos isolados obtidos, seu perfil de resistência, testes fenotípicos e genotípicos.

Cepa	Perfil de resistência aos antimicrobianos	Biofilme	Grupo Filog.	Genes DEC	Genes ExPEC
1.1	AMP, AZM, CHL, CIP, ENO, SXT	NF	B1	<i>ipaH</i>	<i>ecpA</i> , <i>fimH</i>
1.2	AMC, AMP, CAZ, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	F	-	<i>fimH</i> , <i>sitA</i>

Cepa	Perfil de resistência aos antimicrobianos	Biofilme	Grupo Filog.	Genes DEC	Genes ExPEC
1.3	AMP, CHL, CIP, ENO, SXT	NF	B1	<i>ipaH</i>	<i>ecpA, fimH</i>
1.4	AMP, CAZ, CIP, ENO, GEN, SXT, TET*	NF	B2	-	<i>ecpA, fimH, iroN, iss, iutA, hlyF, ompT, sitA, traT</i>
1.5	AMP, AZM, CHL, CIP, ENO, SXT	NF	B1	<i>ipaH</i>	<i>ecpA, fimH</i>
2.1	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
2.2	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
2.3	AMP, AZM, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
2.4	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
2.5	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
3.1	AMP, AZM, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
3.2	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
3.3	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
3.4	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
3.5	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
4.1	AMP, AZM, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
4.2	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
4.3	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
4.4	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
4.5	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN,	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>

Cepa	Perfil de resistência aos antimicrobianos	Biofilme	Grupo Filog.	Genes DEC	Genes ExPEC
	SXT, TET				
5.1	AMP, CHL, CIP, ENO, SXT	NF	B1	<i>ipaH</i>	<i>ecpA, fimH</i>
5.2	AMP, AZM, CHL, CIP, ENO, SXT	NF	B1	<i>ipaH</i>	<i>ecpA, fimH</i>
5.3	AMP, CHL, CIP, ENO, SXT	NF	B1	<i>ipaH</i>	<i>ecpA, fimH</i>
5.4	AMP, CHL, CIP, ENO, SXT	NF	B1	<i>ipaH</i>	<i>ecpA, fimH</i>
5.5	AMP, CHL, CIP, ENO, SXT	NF	B1	<i>ipaH</i>	<i>ecpA, fimH</i>
6.1	AMP, CHL, CIP, ENO, SXT	NF	B1	<i>ipaH</i>	<i>ecpA, fimH</i>
6.2	AMP, CHL, CIP, ENO, SXT	NF	B1	<i>ipaH</i>	<i>ecpA, fimH</i>
6.3	AMP, AZM, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
6.4	AMP, AZM, CHL, CIP, ENO, SXT	NF	B1	-	<i>ecpA, fimH</i>
6.5	AMP, AZM, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
6.6	AMP, CHL, CIP, ENO, SXT	NF	B1	-	<i>ecpA, fimH</i>
6.7	AMP, CHL, CIP, ENO, SXT	NF	B1	<i>ipaH</i>	<i>ecpA, fimH</i>
6.8	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
6.9	AMP, CHL, CIP, ENO, SXT	NF	B1	<i>ipaH</i>	<i>ecpA, fimH</i>
7.1	AMP, CAZ, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
7.2	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
7.3	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
7.4	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
7.5	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
8.5	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
8.6	AMP, CHL, CIP, ENO, GEN,	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>

Cepa	Perfil de resistência aos antimicrobianos	Biofilme	Grupo Filog.	Genes DEC	Genes ExPEC
	SXT, TET				
9.3	AMP, CAZ, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
9.6	AMP, CAZ, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
9.8	AMP, CHL, CIP, ENO, SXT	NF	B1	<i>ipaH</i>	<i>ecpA, fimH</i>
10.3	AMP, AZM, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>
10.6	AMP, AZM, CAZ, CHL, CIP, ENO, GEN, SXT, TET	NF	C	-	<i>ecpA, fimH, traT</i>

(AMC) Amoxicilina-ácido clavulânico; (AMP) Ampicilina; (AZM) Azitromicina; (CFZ) Cefazolina; (CIP) Ciprofloxacino; (CHL) Cloranfenicol; (GEN) Gentamicina; (ENO) Enrofloxacino; (SXT) Sulfametoxazol-trimetoprima; (TET) Tetraciclina; (*) Perfil fenotípico de ESBL; (NF) Não formadora; (-) Negativa para todos os genes.

CONCLUSÃO

Os isolados de *E. coli* deste caso clínico apresentaram multirresistência aos antimicrobianos, além de grande diversidade filogenética e de genes de virulência. A presença de isolados positivos para o gene *ipaH* traz a possibilidade de infecção por EIEC, apesar disso, os sinais clínicos e algumas características genotípicas de uma das cepas ainda mantêm a hipótese de que a doença tenha sido causada por AIEC. Deste modo, os testes fenotípicos confirmatórios de AIEC devem ser realizados, visando identificar o real causador da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANDA, K. R. S. et al. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiology Letters**, v. 267, n. 2, p. 145–150, 2007.
- ARGENTA, F. F. et al. Histiocytic ulcerative colitis in an American Staffordshire Terrier. **Journal of Comparative Pathology**, v. 165, p. 40–44, 2018.
- BELOTSEKOVSKY, I.; SANSONETTI, P. J. *Shigella* and Enteroinvasive *Escherichia coli*. In: **Assessment & Evaluation in Higher Education**. [s.l: s.n.]. v. 37p. 1–26.
- BEVAN, E. R.; JONES, A. M.; HAWKEY, P. M. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 8, p. 2145–2155, 2017.
- BIRAN, D.; RON, E. Z. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. In: **Assessment & Evaluation in Higher Education**. [s.l: s.n.]. v. 37p. 149–161.
- BLACKBURN, D. et al. Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1781–1784, 2009.
- BLANCO, M. et al. Polymerase chain reaction for detection in *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, n. 1–2, p. 95–101, 1996.
- BOWE, P. S.; VAN KRUININGEN, H. J.; ROSENDAL, S. Attempts to produce granulomatous colitis in boxer dogs with a mycoplasma. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 46, n. 4, p. 430–433, 1982.
- BRAZ, V. S.; MELCHIOR, K.; MOREIRA, C. G. *Escherichia coli* as a multifaceted pathogenic and versatile bacterium. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. December, p. 1–9, 2020.
- CARVALLO, F. R. et al. Histiocytic typhlocolitis in two colony Beagle dogs. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, n. 2, p. 219–221, 2015.
- CERNA, J. F.; NATARO, J. P.; ESTRADA-GARCIA, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2138–2140, 2003.
- CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 214–226, 2012.

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–4558, 2000.

CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals approved standard. Document M31-A3, 3th ed. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fifth informational supplement. Document M100, 28th ed. CLSI, Wayne, PA, USA, 2018.

CRAVEN, M. et al. W1250 Genome-wide association scan reveals polymorphisms in the P67phox subunit (NCF2) of the NADPH oxidase complex in Boxer dogs with adherent and invasive *E. coli*-associated granulomatous colitis: A potential model of chronic granulomatous disease. **Gastroenterology**, v. 138, n. 5, p. S-683, 2010a.

CRAVEN, M. et al. Antimicrobial resistance impacts clinical outcome of granulomatous colitis in Boxer dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 4, p. 819–824, jul. 2010b.

CRAVEN, M.; MANSFIELD, C. S.; SIMPSON, K. W. Granulomatous colitis of Boxer dogs. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 41, n. 2, p. 433–445, 2011.

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

DAVIES, D. R. et al. Successful management of histiocytic ulcerative colitis with enrofloxacin in two Boxer dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 1–2, p. 58–61, 2004.

DOGAN, B. et al. Inflammation-associated adherent-invasive *Escherichia coli* are enriched in pathways for use of propanediol and iron and M-cell translocation. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 20, n. 11, p. 1919–1932, 2014.

DOGAN, B. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* associated with granulomatous colitis of Boxer dogs. **Antibiotics**, v. 9, n. 9, p. 1–16, 2020.

DOZOIS, C. M. et al. Relationship between the tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4145–4154, 1 jul. 2000.

DUBREUIL, J. D.; ISAACSON, R. E.; SCHIFFERLI, D. M. Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, v. 7, n. 1, p. 139–148, 11 jan. 2016.

- EL-ABASSI, R. et al. Whipple's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 377, p. 197–206, 2017.
- ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: A genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 281–298, 2012.
- FLECKENSTEIN, J. M.; KUHLMANN, F. M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. **Current Infectious Disease Reports**, v. 21, n. 3, p. 1–16, 2019.
- GLASSER, A. L. et al. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5529–5537, 2001.
- GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3–30, 2016.
- GOMEZ, J. A. et al. Canine histiocytic ulcerative colitis - an ultrastructural study of the early mucosal lesion. **The American Journal of Digestive Diseases**, v. 22, n. 6, p. 485–496, 1977.
- GUERRANT, R. L. et al. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. **Nutrition Reviews**, v. 66, n. 9, p. 487–505, 2008.
- HOSTUTLER, R. A. et al. Antibiotic-responsive histiocytic ulcerative colitis in 9 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 4, p. 499–504, 2004.
- JENKINS, C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. In: **Assessment & Evaluation in Higher Education**. [s.l: s.n.]. v. 37p. 27–50.
- JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 2018.
- JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261–272, jan. 2000.
- JOHNSON, J. R.; STELL, A. L.; DELAVARI, P. Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1306–1314, 2001.
- JOHNSON, T. J. et al. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3987–3996, 2008.
- LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 5, p. 1189–93, maio 1992.

- LE BOUGUÉNEC, C.; SERVIN, A. L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Hitherto unrecognized pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, v. 256, n. 2, p. 185–194, 2006.
- LIMA, A. A. M.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; HAVT, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* subclinical and clinical infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 31, n. 5, p. 433–439, 2018.
- LUCENA, R.; NOVALES, M.; GINEL, P. J. Granulomatous colitis in two French Bulldogs unresponsive to fluoroquinolone antimicrobials: A case report. **Veterinari Medicina**, v. 62, n. 5, p. 292–294, 2017.
- MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.
- MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 1–2, p. 2–12, 2013.
- MANCHESTER, A. C. et al. Association between granulomatous colitis in French Bulldogs and invasive *Escherichia coli* and response to fluoroquinolone antimicrobials. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 1, p. 56–61, 2013.
- MANCHESTER, A. C. et al. *Escherichia coli*-associated granulomatous colitis in dogs treated according to antimicrobial susceptibility profiling. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. December, p. 1–12, 2020.
- MANSFIELD, C. S. et al. Remission of histiocytic ulcerative colitis in Boxer dogs correlates with eradication of invasive intramucosal *Escherichia coli*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 5, p. 964–969, set. 2009.
- MARTINEZ-MEDINA, M. et al. Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). **BMC Microbiology**, v. 9, 2009a.
- MARTINEZ-MEDINA, M. et al. Molecular diversity of *Escherichia coli* in the human gut: New ecological evidence supporting the role of adherent-invasive *E. coli* (AIEC) in Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 15, n. 6, p. 872–882, 2009b.
- MARTINEZ-MEDINA, M. et al. Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 3968–3979, 2009c.
- MARTINEZ-MEDINA, M.; GARCIA-GIL, L. J. *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent-invasive *Escherichia coli* pathogenicity. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 5, n. 3, p. 213, 2014.

- MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: Infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, p. 916–932, 2013.
- MUELLER, M. et al. Favourable long-term outcome of granulomatous colitis involving two *Escherichia coli* strains with multiple antimicrobial resistances in a French Bulldog in Germany . **Veterinary Record Case Reports**, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2016.
- MYDOCK-MCGRANE, L. K.; HANNAN, T. J.; JANETKA, J. W. Rational design strategies for FimH antagonists: New drugs on the horizon for urinary tract infection and Crohn’s disease. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 7, p. 711–731, 2017.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142–201, 1 jan. 1998.
- NGUYEN, Y.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. July, p. 90, 2012.
- PALMELA, C. et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 67, n. 3, p. 574–587, 2018.
- PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598–602, 1998.
- PITOUT, J. D. D. et al. Development and clinical validation of a molecular diagnostic assay to detect CTX-M-type β -lactamases in Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 3, p. 291–297, 2007.
- RENDÓN, M. A. et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 25, p. 10637–10642, 2007.
- SARSHAR, M. et al. FimH and anti-adhesive therapeutics: A disarming strategy against uropathogens. **Antibiotics**, v. 9, n. 7, p. 1–16, 2020.
- SCHEMBRI, M. A. et al. Molecular characterization of the *Escherichia coli* FimH adhesin. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. S28–S31, 2001.
- SCHULTSZ, C. et al. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2393–2397, 1994.
- SHAWKI, A.; MCCOLE, D. F. Mechanisms of intestinal epithelial barrier dysfunction by adherent-invasive *Escherichia coli*. **Cmgh**, v. 3, n. 1, p. 41–50, 2017.

- SILVA, K. C. DA; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: Impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91–99, 2012.
- SIMPSON, K. W. et al. Adherent and invasive *Escherichia coli* is associated with granulomatous colitis in Boxer dogs. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 8, p. 4778–4792, 2006.
- SIVIGNON, A. et al. The potential of FimH as a novel therapeutic target for the treatment of Crohn's disease. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 21, n. 9, p. 837–847, 2017.
- STOKES, J. E. et al. Histiocytic ulcerative colitis in three non-Boxer dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 37, n. 5, p. 461–465, 2001.
- SUBRAMANIAN, S. et al. Replication of colonic Crohn's disease mucosal *Escherichia coli* isolates within macrophages and their susceptibility to antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 427–434, 2008.
- TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207–217, 2010.
- UZAL, F. A.; PLATTNER, B. L.; HOSTETTER, J. M. **Alimentary System**. Sixth Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 2.
- VAN DER GAAG, I. et al. Histiocytic ulcerative colitis in a French Bulldog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 19, n. 1–12, p. 283–290, jan. 1978.
- VAN KRUININGEN, H. J. et al. A granulomatous colitis of dogs with histologic resemblance to Whipple's disease. **Veterinary Pathology**, v. 2, n. 6, p. 521–544, 1965.
- VAN KRUININGEN, H. J. The ultrastructure of macrophages in granulomatous colitis of Boxer dogs. **Veterinary Pathology**, v. 12, n. 5–6, p. 446–459, 1975.
- VAN KRUININGEN, H. J.; CIVCO, I. C.; CARTUN, R. W. The comparative importance of *E. coli* antigen in granulomatous colitis of Boxer dogs. **Apmis**, v. 113, n. 6, p. 420–425, 2005.
- WAKIMOTO, N. et al. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 5, p. 687–690, 2004.
- WASIŃSKI, B. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* – threat connected with food-borne infections. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 26, n. 4, p. 532–537, 2019.
- YAMAMOTO, S. et al. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 85–90, 1995.