

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS-FCAV
CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP**

**Análise de cepas de *Escherichia coli* Shiga toxigênica (STEC) e *E. coli*
patogênica extraintestinal (ExPEC) isoladas de cachorros diarréicos
atendidos em clínica privada no município de Ituverava, SP.**

Cleber Jacob Silva de Paula
Médico Veterinário

Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
mestre em microbiologia agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
AGOSTO- 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CLEBER JACOB SILVA DE PAULA – nascido em Ituverava – SP, no dia 17 de janeiro de 1978, graduou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), campus de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em dezembro de 2002. Durante a graduação desenvolveu trabalho de iniciação científica na área de Clínica médica de grandes animais da FCAV – UNESP sob a orientação do Prof. Dr. Luís Carlos Marques, que também orientou seu trabalho de conclusão de curso. Desde sua formatura até o presente momento atua como médico veterinário clínico de pequenos animais na cidade de Ituverava SP.

Ofereço

Aos meus pais,

Alaor e Ione

Alicerce de toda minha formação, com dedicação e amor, não medindo esforços para minha formação, não só profissional, mas também no meu desenvolvimento como pessoa. Por eles tenho minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos,

Jayter e Cynthia

Antes de tudo amigos fiéis, apoiando em cada momento minhas decisões mais importantes, meu muito obrigado.

Dedico

À minha namorada Carla,

Sempre me incentivando com palavras de amor e carinho. Sua compreensão, em meus momentos mais difíceis, foi a força que necessitei para seguir em frente. Isto é apenas mais uma evidência de que nosso laço é forte e duradouro.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que sem Ele não somos nada.

Ao amigo Anderson, pela confiança, pela minha indicação e por ajudar a entender melhor o universo da microbiologia em conceitos e técnicas.

Ao Prof. Dr. José Moacir Marin, pela oportunidade que me foi dada, pela confiança necessária para que o trabalho fluísse e pela excelente orientação.

À Marly e Marisa, amigas de trabalho me deram força para seguir em frente, ajudando também em horários, que necessitei, e neste trabalho realizado com as amostras e idéias produtivas.

Aos amigos do laboratório, Tânia, Edilene, Patrícia Rangel e Patrícia Cardoso e aos funcionários do Departamento de Microbiologia, que de diferentes formas contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Às funcionárias da seção de pós-graduação, sempre atenciosas e prestativas.

À Profa. Dra. Maria Amália Brunini, por dispor seu laboratório na FAFRAM.

Ao biotério da USP de Ribeirão Preto

Ao hemocentro de Ribeirão Preto

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Histórico.....	3
2.2 A <i>Escherichia coli</i>	3
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> comensal.....	4
2.2.2 <i>Escherichia coli</i> Patogênica.....	5
2.2.2.1- <i>Escherichia coli</i> Shiga-Toxigênica (STEC).....	6
2.2.2.2- <i>Escherichia coli</i> extra-intestinal (ExPEC).....	8
2.3 Fatores de Virulência.....	10
2.3.1 Hemolisina.....	10
2.3.2 Aerobactina.....	11
2.3.3 Pesquisa de Adesinas.....	13
2.3.4 Genes de Virulência.....	14
2.4 Antimicrobianos e suas Resistências.....	15
2.4.1 Grupos de Antimicrobianos e suas Resistências.....	20
2.4.1.1 Betalactâmicos.....	21
2.4.1.2 Aminoglicosídeos	22
2.4.1.3 Tetraciclinas.....	23
2.4.1.4 Quinolonas.....	24
2.4.1.5 Sulfonamidas.....	25
2.4.2 Origem da Resistência.....	26
3. OBJETIVOS.....	28

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Coleta.....	29
4.2 Isolamento e Identificação.....	30
4.3 Manutenção das Amostras.....	33
4.4 Sensibilidade a Antimicrobianos.....	35
4.5 Utilizados para Pesquisa de Fatores de Virulência em <i>E.coli</i>	37
4.5.1 Produção de Hemolisinas.....	37
4.5.2 Teste de Hemaglutinação.....	38
4.5.3 Produção de Aerobactina.....	41
4.6 DNA Bacteriano.....	45
4.6.1 Preparação para Amplificação	45
4.6.2 Amplificação através da Técnica de PCR.....	45
5. RESULTADOS.....	49
5.1 Origem das Amostras.....	49
5.2 Resistência Antimicrobiana.....	50
5.3 <i>Escherichia coli</i> Shiga-Toxigênica.....	54
5.4 <i>Escherichia coli</i> Extraintestinal.....	57
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÕES.....	68
8. REFERÊNCIAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Foto da bactéria <i>Escherichia coli</i>	2
Figura 02 - Placa contendo meio Mac Conkey.....	29
Figura 03 – Tubos contendo meio Rugai modificado.....	32
Figura 04 – Placa de antibiograma contendo 12 discos de antimicrobianos.....	37
Figura 05 . Porcentagem de cães machos e fêmeas, individualizados de acordo com suas respectivas idades.....	50
Figura 06 . Susceptibilidade antimicrobiana das 92 cepas de <i>E. coli</i> isoladas de cães diarréicos em Ituverava, SP, BR.....	51
Figura 07 - Distribuição da multirresistência para 12 agentes antimicrobianos entre 92 cepas de <i>E. coli</i> isoladas de cães diarréicos na cidade de Ituverava, estado de São Paulo, Brasil.....	53
Figura 08 – Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR).....	55
Figura 09 – Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR).....	56
Figura 10 – Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Primers usados na PCR para amplificação dos fragmentos específicos dos genes <i>stx 1</i> , <i>stx 2</i> e <i>eae</i>	46
Tabela 02- Primers usados na PCR para amplificação dos fragmentos específicos dos genes <i>pap</i> , <i>sfa</i> , <i>afa</i>	48
Tabela 03- Teste de susceptibilidade antimicrobiana de 92 cepas de <i>E.coli</i> isoladas de cães diarréicos em Ituverava, SP, BR.....	52
Tabela 04- Distribuição dos fenótipos mais freqüentes de cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de cachorros diarréicos, apresentando multiresistência a drogas antimicrobianas.....	53
Tabela 05- Perfil dos genes de virulência de <i>Escherichia coli</i> isolados de vinte e cinco cães diarréicos (92 isolados) em Ituverava, estado de São Paulo, Brasil entre Janeiro e Dezembro de 2006.....	54
Tabela 06- Teste de susceptibilidade antimicrobiana de 21 cepas de <i>E. coli</i> portadoras dos genes <i>stx</i> ou <i>eae</i> (fatores de virulência) isoladas de cães diarréicos em Ituverava, SP, BR.....	57
Tabela 07 - Fatores de virulência característicos de ExPEC detectados nas 92 cepas de <i>E. coli</i> isolados de cães diarréicos.....	58
Tabela 08- Teste de susceptibilidade antimicrobiana das 6 cepas de <i>E. coli</i> extra-intestinais isoladas de cães diarréicos em Ituverava, SP, BR.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

afa	Adesina afimbrial
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
°C	Graus Celsius
Caldo EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
CNF	Fator Necrozante Citotóxico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Extraintestinal
FV	Fator de Virulência
g	Gramma
ITU	Infecção do Trato Urinário
LB	Luria Bertani
ml	Mililitro
MR	Manose resistente
MS	Manose Sensível
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PABA	Ácido para-aminobenzóico
PAI	Ilha de Patogenicidade
pap	pili associada a pielonefrite
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
P/V	Peso/Volume

q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
sfa	Adesina S Fimbria
THFA	Ácido Teraidrofólico
TSB	Caldo Trypticase de Soja

Resumo

Cachorros têm sido propostos como possíveis reservatórios de cepas de *Escherichia coli* patogênicas que causam infecções em cachorros e em humanos. Entre Janeiro e Dezembro de 2006, 92 cepas de *E. coli* foram analisadas para a detecção da presença de genes produtores de toxina Shiga-like (*stx 1* e *stx 2*) e o gene da intimina (*eae*). Doze cepas de *E. coli* Shigatoxigênica (STEC) foram detectadas por PCR como portadoras dos genes de Shiga toxina, 7 cepas do gene *stx 1* (7,6%), 5 do *stx 2* (5,4%) e nenhuma delas apresentando ambos os genes. Nove (9,8%) das cepas de *E. coli* apresentaram o gene *eae* e não eram produtoras de Shiga toxina. Os isolados de *E. coli* foram também examinados para a detecção dos genes codificadores de adesinas (*pap*, *sfa* e *afa*), hemolisina e aerobactina. A frequência dos genes de virulência detectados nestes isolados foi de 12,0% *pap*, 1,0% *sfa*, 10,0% hemolisina e 6,5% aerobactina. Seis destes isolados foram caracterizados como cepas de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC). Entre as cepas de STEC e ExPEC foi encontrado um alto nível de resistência a agentes antimicrobianos (estreptomicina com 81% e 100% e cefalotina com 85,7% e 50% respectivamente) e algumas delas foram caracterizadas como *E. coli* resistentes a múltiplas drogas (MDREC), o que representa um motivo de preocupação devido ao risco de disseminação dos genes de resistência para a microbiota dos seres humanos.

Palavras Chave: *Escherichia coli*, STEC, ExPEC, cachorro, resistência antimicrobiana, resistência a múltiplas drogas.

1. Introdução

A *Escherichia coli* Shiga toxigênica (STEC) e a *E. coli* Attaching – Effacing (AEEC) têm sido associadas à doença diarréica em cachorros. As bactérias STEC possuem os genes responsáveis pela formação de uma toxina semelhante a Shiga-toxina, que são os genes *stx1* e *stx2*. Já as AEEC possuem a intimina, uma adesina codificada pelo gene *eae*.

A *E. coli* extraintestinal (ExPEC) é uma cepa especializada, que tem como característica principal a presença de múltiplos fatores de virulência (FV), tais como: hemolisina, aerobactina e fímbrias. Estes fatores possibilitam a colonização da bactéria na superfície da mucosa do hospedeiro subvertendo seus mecanismos de defesa a fim de obter nutrientes essenciais, como por exemplo, o ferro facilitando a instalação da infecção.

As ExPEC são atualmente definidas como comensais no trato intestinal do hospedeiro, porém podem migrar para sítios estéreis causando infecções como: infecção do trato urinário (ITU), bacteremias e meningite neonatal bacteriana.

A possível transferência dessas cepas como zoonose, assim como transferência de resistência antimicrobiana tem despertado o interesse em pesquisas na área.

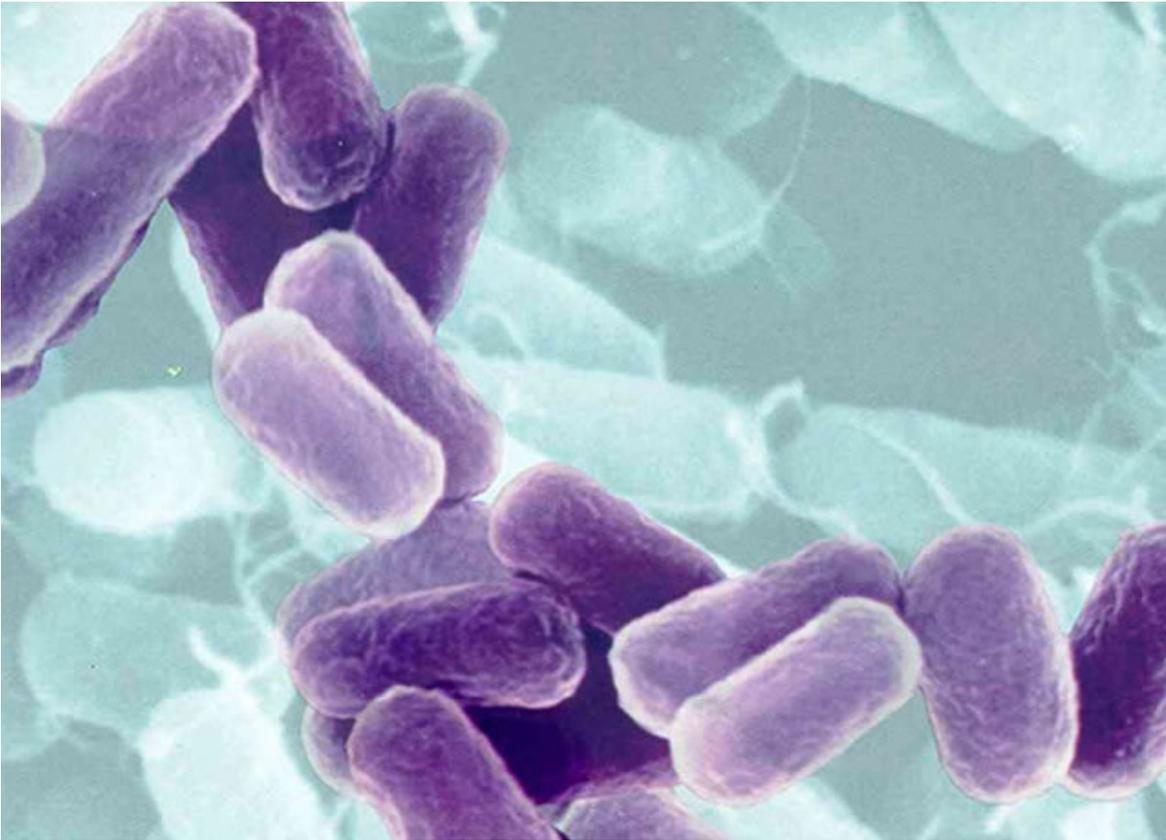


Figura 01 - Foto da bactéria *Escherichia coli* obtida no site:
http://biyolojielitim.yyu.edu.tr/k/E.c/images/Escherichia%20coli_3.jpg.jpg

2- Revisão da Literatura

2.1- Histórico

Descrita pela primeira vez por Theodor Von Escherich em 1885 a *Escherichia coli* foi inicialmente denominada de *Bacterium coli*. Em função de fazer parte da microbiota da maioria dos animais e do homem, ela foi por muito tempo considerada não patogênica. No entanto, ao longo de anos de pesquisa, esta enterobactéria vem sendo associada a infecções localizadas e sistêmicas tanto em seres humanos quanto em animais (KONEMAN *et al.*, 1997).

A *E. coli* foi muito estudada ao longo da história por vários pesquisadores. Em 1908 GUYOT observou que algumas cepas de *E. coli* eram capazes de aglutinar glóbulos vermelhos e mais tarde, em 1943, ROSENTHAL evidenciou que culturas com capacidade de hemaglutinação também poderiam aglutinar esperma, leveduras e até mesmo pólen. A propriedade de hemaglutinação foi associada com a expressão de estruturas de superfície na bactéria, as quais são finas e filamentosas denominadas de fímbrias ou pili (DUGUID *et al.*, 1955).

2.2 – A *Escherichia coli*

As cepas de *E. coli* são freqüentemente identificadas através de reações bioquímicas. Contudo, esse método deve ser usado com cautela,

porque apenas 90% das cepas de *E.coli* são lactose positiva; algumas cepas de *E.coli* diarréicas, incluindo muitas cepas de *E.coli* enteroinvasiva, são lactose negativa. O teste do indol, positivo em 99% das cepas de *E.coli*, é o melhor teste para identificação dos outros membros da família *Enterobacteriaceae* (TRABULSI *et al.*, 2002).

A sorotipagem ocupa um lugar de destaque no estudo deste microrganismo. KAUFFMAN (1944 apud NATARO & KAPER, 1998) propôs um esquema para a classificação sorológica de *E.coli*, que permanece sendo usado até os dias atuais. De acordo com o esquema de KAUFFMAN, as *E.coli* são sorotipadas com base em seu antígeno somático (O), flagelar (H) e capsular (K), sendo que a quantidade de diferentes antígenos identificados aumenta a cada ano. São conhecidos atualmente 174 antígenos O 100 antígenos K, e 57 antígenos H que, por convenção internacional, são designados por números arábicos, colocados em seguida a cada letra, como, por exemplo, O₂₆:K₆₀:H₁₁. Nem todas as amostras de *E.coli* sejam do intestino humano ou de qualquer outro local do organismo, apresentam os três tipos de antígenos ao mesmo tempo.

2.2.1- *Escherichia coli* comensal

A *E. coli* é o principal constituinte da microbiota fecal facultativa na maioria dos humanos saudáveis, outros mamíferos e pássaros (JAWETZ *et al.*, 1998). Estas cepas de *E. coli* são consideradas comensais por se adaptarem passivamente com seu hospedeiro sem causar doenças, sendo que na sua

maioria origina-se da *E. coli* do grupo filogenético A (RUSSO & JOHNSON, 2000).

Dos 174 sorogrupos O identificados, 60 deles foram encontrados na espécie humana. E destes 60, cerca de 25 fazem parte da microbiota intestinal normal, e a maioria também está associada à infecção urinária, meningite e bacteremia. Os outros 35 sorogrupos são agentes de infecções intestinais (NATARO & KAPER, 1998).

2.2.2 – *Escherichia coli* Patogênica

A *Escherichia coli* é uma das bactérias mais estudadas e uma das mais comumente isoladas no laboratório clínico de microbiologia. As cepas de *E. coli* biologicamente significantes para o ser humano podem ser classificadas (com base em sua genética e critérios clínicos) em três grandes grupos, que são: as comensais, as patogênicas intestinais (entéricas ou diarréicas) e as patogênicas extraintestinais (RUSSO & JOHNSON, 2000).

Existem relatos de colibacilose em cães e gatos, embora o número seja mais reduzido. Muitos pesquisadores admitem a participação de cães, filhotes ou adultos sem manifestações de sintomas de colibacilose, na cadeia epidemiológica como reservatório de *E. coli* patogênica ao homem (DROLET, 1994).

De acordo com a patogenicidade, as *E.coli* foram classificadas em sete classes: 1- *Escherichia coli* enterotoxigênica - ETEC , 2- *Escherichia coli* enteropatogênica - EPEC , 3- *Escherichia coli* enterohemorrágica - EHEC , 4-

Escherichia coli produtora de verotoxina - VTEC, 5- *Escherichia coli* enteroinvasiva - EIEC , 6- *Escherichia coli* enteroagregativa - EaggEC ou EAEC 7- *Escherichia coli* difusamente aderente DAEC (NATARO & KAPER, 1998).

2.2.2.1- *Escherichia coli* Shiga-Toxigênica (STEC)

As STEC causam diarreia aquosa inicial que pode progredir em [colite](#) hemorrágica e [síndrome hemolítico](#) - urêmico (que ocorre em 5% das infecções por STEC). Têm fímbrias aderentes e produzem uma toxina semelhante a shiga-toxina produzida pela *Shigella sp.* Podem provocar anemia, trombocitopenia e insuficiência renal aguda potencialmente perigosa.

Um patógeno emergente, a *E. coli* produtora de shiga-toxina (STEC) do sorogrupo O157, é designada como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e é responsável por muitos surtos de colite hemorrágica e síndrome urêmica hemorrágica (PATON & PATON, 1998; CAPRIOLI et al, 2005).

As STEC são dificilmente encontradas na microbiota fecal de hospedeiros saudáveis, mas são essencialmente obrigatórias em gastroenterites ou colites quando ingeridas em quantidades suficientes (PELCZAR et al, 1997).

PRADA *et al*, em 1991 estudou as características das cepas α -hemolíticas de *E. coli* isoladas de cães com gastroenterite e notou que das 24 cepas produtoras de hemolisina (Hly⁺) 8 possuíam os genes para Hly plasmidial e 16 para o gene cromossômico. Notou também que doze das cepas mostraram atividades enterotóxicas em diferentes provas. Entre estas,

três cepas O42:H37 e duas O70:H- que carregavam o gene Hly plasmidial também apresentaram outros plasmídios com os genes de enterotoxinas termoestáveis Stx 1. A produção de α - hemolisina esta intrinsecamente ligada com a produção de Fator Citotóxico Necrosante (CNF), que foi detectado em 17 das 24 amostras, sendo 16 do tipo CNF1 e 1 de tipo desconhecido.

Ruminantes domésticos, especialmente bovinos, ovinos e caprinos são descritos como os principais reservatórios de cepas STEC, que causam infecções em humanos (CHAPMAN et al, 2001). Entretanto em outros animais domésticos como gatos e cachorros também foi descrita a ocorrência de cepas STEC (BEUTIN et al, 1993; HAMMERMULLER et al, 1995; STAATS et al, 2003; BENTANCOR et al, 2007).

A transmissão ocorre predominantemente por consumo direto de carne mal-cozida, produtos lácteos não pasteurizados e vegetais contaminados (PATON & PATON, 1998; CAPRIOLI et al, 2005). Outras formas de transmissão são o contato direto entre humanos e animais e a contaminação fecal (MEAD & GRIFFIN, 1998; BENTANCOR et al, 2007). A cepa STEC mais freqüentemente associada com doença clínica é o sorotipo O157:H7, entretanto existem mais de duzentos diferentes sorotipos de cepas de STEC alguns dos quais associados com doenças em humanos (LAW, 2000), uma vez que cepas não-O157 são mais prevalentes em animais e como contaminantes de alimentos, assim os seres humanos estão provavelmente mais expostos a estas cepas (BEUTIN et al, 2004; BLANCO et al, 2004).

Animais de estimação podem ser reservatórios naturais de vários organismos potencialmente causadores de doença em seres humanos,

especialmente as crianças são as mais afetadas neste jogo de transferência de genes, uma vez que elas não apresentam os devidos cuidados com a higiene (RODRIGUES et al, 2004). O eventual papel dos cães como reservatórios de cepas STEC ainda não está totalmente esclarecido.

As cepas de *E. coli* attaching-effacing (AEEC) são caracterizadas por sua habilidade em causar lesões do tipo A/E na mucosa intestinal de hospedeiros humano e de animal causando diarreia. A geração de lesões do tipo A/E é iniciada por íntima adesão da bactéria com os enterócitos a qual é mediada pela intimina, uma adesina codificada pelo gene *eae* (NATARO & KAPER, 1998). A detecção do gene *eae* foi definida como um indicador para a presença de um fator de patogenicidade A/E em uma cepa (KNUTTON et al, 1991). Infecções naturais com AEEC em cães também já foram descritas (BROES et al, 1998; BEAUDRY et al, 1996; NAKAZATO et al, 2004).

2.2.2.2- *Escherichia coli* extraintestinal (ExPEC)

A *E. coli* extraintestinal é a causa mais comum de infecção do trato urinário (ITU), um grupo heterogêneo de desordens que, coletivamente causam morbidade considerável, perdendo produtividade e aumentando custos de cuidados com a saúde (PATON, et al, 1991).

O agente etiológico mais comum causador de ITU em pacientes ambulatoriais e hospitalizados é *E. coli*, responsável por 75 - 90% dos isolados de ITU não complicadas (GUPTA et al, 2001; KARLOWSKY et al, 2002).

Existe uma ampla variedade de manifestações clínicas associadas a ITU, assim como a recorrência da infecção e o aparecimento de seqüelas. Os fatores relacionados a susceptibilidade individual e os fatores de virulência das bactérias explicam esta variabilidade (SOBEL, 1991).

A infecção causada por ExPEC não tem chamado a atenção pública como a infecção causada por *E. coli* patogênica intestinal, isto porque em contraste com a *E. coli* O157:H7, a infecção por ExPEC não ocorre de forma epidêmica e sim de forma discreta, aparentemente não é proveniente de alimento contaminado e muitas vezes, causa somente uma pequena morbidade no hospedeiro ou um leve comprometimento, sendo assim a infra-estrutura da saúde pública trabalha constantemente para detectar as infecções causadas por *E. coli* patogênica intestinal tornando-as notória, enquanto que as infecções causadas por ExPEC não são citadas ou dada a devida importância (JOHNSON & RUSSO, 2002).

O principal risco oferecido pela colonização das ExPEC no intestino humano seria a transferência horizontal dos fatores de virulência, que podem converter as cepas comensais em potenciais cepas patogênicas. Os fatores responsáveis por esse processo representam um mistério para a comunidade científica (JOHNSON et al, 2001).

Os genes para múltiplos fatores de virulência freqüentemente estão juntos em grandes blocos de cromossomos chamados de ilhas de patogenicidade (PAIs) (RUSSO & JOHNSON, 2000). Presume-se que os genes para os FVs unem-se nessas PAIs pois ganham vantagens quando presentes em grupo e

sendo assim são transmitidas horizontalmente para outra bactéria (JOHNSON & RUSSO, 2002).

2.3- Fatores de Virulência

2.3.1 Hemolisina

A capacidade da *E. coli* em provocar a lise em eritrócitos foi observada pela primeira vez por KAYSER em 1903 (in CAVALIERI et al, 1985), que também notou no sobrenadante da cultura contendo *E. coli* uma atividade hemolítica após serem filtrados através do filtro de Chimberland.

Em 1963 SMITH foi o primeiro a comprovar que nas mesmas condições de crescimento, algumas cepas hemolíticas de *E. coli* poderiam produzir dois diferentes tipos de proteínas simultaneamente em placas de agar sangue, a alfa-hemolisina e a beta-hemolisina. A alfa-hemolisina se caracteriza por apresentar alto peso molecular e pode ser excretada pela bactéria, possuindo ação mais acentuada sobre linfócitos, enquanto que a beta-hemolisina permanece ligada à parede celular e manifesta ação inibitória durante a fagocitose e quimiotaxia.

As hemolisinas são proteínas que são secretadas extracelularmente (exoproteínas) por algumas cepas de *E. coli*, as quais possuem uma ação citotóxica, provocando lise em uma variedade de tipos de células incluindo eritrócitos, fibroblastos, granulócitos e outros leucócitos humanos (CAVALIERI et al, 1985; KONIG et al, 1986).

Cerca de 50% das cepas de *E. coli* que causam infecções extraintestinais em humanos secretam hemolisina. Essas cepas recebem o nome de hemolíticas, nas quais se observam zonas de hemólise ao redor da colônia de bactérias em placas de agar sangue (HUGHES et al, 1983).

GOEBEL et al (1974 in CAVALIERI et al, 1985) demonstraram que as cepas de *E. coli* hemolíticas possuem um ou mais plasmídios envolvidos na síntese e secreção das hemolisinas. Esses plasmídios funcionam como um cluster, mas ainda não está bem esclarecido onde essas proteínas são traduzidas e por quais mecanismos são liberadas (FELMLEE et al, 1985).

A hemolisina pode contribuir no processo da doença de três modos: a) por ser citotóxica para as células do tecido “in vitro”, logo deve prejudicar as células “in vivo” e contribuir diretamente para a patologia do tecido; b) afetando os mecanismos de defesa do hospedeiro (leucócitos e suas funções) permitindo a sobrevivência do microorganismo; c) lise do eritrócito, mecanismo através do qual o microorganismo irá obter ferro para permanecer vivo e talvez para continuar a síntese de hemolisina (CAVALIERI et al, 1985). A enterohemolisina é um outro tipo de hemolisina, que é produzida na fase estacionária de multiplicação da *E. coli*, sendo relacionado por muitos pesquisadores às verotoxinas em humanos e bovinos.

2.3.2 Aerobactina

A habilidade em expressar um sistema de alta afinidade para captação de ferro tem sido relacionada com a virulência em uma variedade de

microorganismos patogênicos para animais e humanos (BINDEREIF & NEILANDS, 1983). A produção da aerobactina está relacionada com este aumento na capacidade de captação do ferro, necessário para o transporte de oxigênio bacteriano, síntese de DNA, transporte de elétrons e metabolismo de peróxidos (JOHNSON, 1991).

Embora o ferro seja abundante nos organismos parasitados, ele é quantitativamente insolúvel em meio aeróbico e em pH biológico (MONTGOMERIE et al, 1984), na maioria das vezes é encontrado intracelularmente e a quantidade extracelular é ligada a glicoproteínas, à qual possui grande afinidade (SHARMA et al, 1991). Isto levou à evolução de um mecanismo especial para a solubilização e transporte desse elemento.

Os principais mecanismos da *E. coli* para aquisição de ferro em ambientes com sua quantidade limitada são: a) a produção da hemolisina, que provoca a destruição da membrana do eritrócito liberando o ferro em forma de hemoglobina e b) a geração de moléculas de baixo peso molecular chamadas de sideróforos, que são compostos quelantes de ferro que solubilizam e seqüestram o ferro do tecido do hospedeiro para uso da bactéria. Existem dois tipos de sideróforos, o tipo catecol (enterocolina) o qual é encontrado na maioria das amostras de *E. coli* e o tipo mediado por hidroxamato (aerobactina) é encontrado em algumas amostras (MONTGOMERIE et al, 1984; WILLIAMS & CARBONETTI. 1986; JOHNSON et al, 1988; SHARMA et al, 1991).

O sistema aerobactina foi inicialmente descrito como sendo codificado pelo plasmídio COL V (WILLIAMS, 1979), porém mais tarde foi observado que também podem ser codificados por outros plasmídios ou genes cromossomais

(VALVANO & CROSA, 1984; BINDEREIF & NEILANDS, 1985; VALVANO et al, 1986; LINGGOOD et al 1987; MARTINEZ et al, 1987).

Tanto no homem quanto nos animais não há um esclarecimento completo quanto à captação do ferro exógeno em infecção por *E. coli*, mas sabe-se que é um importante fator de virulência ligado a processos septicêmico extraintestinal.

2.3.3 Pesquisa de Adesinas

Para que microorganismos possam colonizar um hospedeiro, eles precisam se aderir a este, causando assim infecções. A aderência é uma propriedade importante a fim de se evitar que, tais microorganismos patogênicos seja vírus, bactérias, entre outros, sejam arrastados pelo fluxo normal de fluidos orgânicos (sangue, urina, conteúdo intestinal, etc.). (JOHNSON, 1991).

A proteína responsável por essa aderência da bactéria ao hospedeiro é denominada de adesina (TOMISAWA et al, 1989). Tais adesinas podem ser classificadas e caracterizadas sorologicamente de acordo com o perfil de hemaglutinação e seus receptores específicos (SVANBORG-ÉDEN & HANSON, 1978)

A aderência a uma célula uroepitelial foi reconhecida quando cepas de *E. coli* que causavam ITU aglutinaram eritrócitos humanos na presença de manose. Elas foram identificadas como tendo uma hemaglutinação manose resistente (HAMR) (GREEN & THOMAS, 1981). Desde então as adesinas

expressas por *E. coli* uropatogênica têm sido classificadas como hemaglutininas manose sensíveis (MS) ou manose resistentes (MR), dependendo de sua habilidade em aglutinar eritrócitos na presença de compostos com D-manose (HAGBERG et al, 1981). Hemaglutininas MR têm sido ainda subdivididas de acordo com suas especificidades para receptores. Com base nessa especificidade podemos considerar dois grupos: os que reconhecem os antígenos do grupo sanguíneo P humano (Fímbria P) e outra denominada adesina X ou fímbria X que possui especificidade para receptores desconhecidos. Um grupo de adesinas X está associado freqüentemente à *E. coli* O75, que tem mostrado afinidade com o antígeno do grupo sanguíneo Dr e parece ser importante nas infecções vesicais (JOHNSON, 1991).

Em geral amostras que causam infecção no trato urinário superior possuem fímbria tipo I em adição à fímbria P, sugerindo que o tipo I deve aumentar o potencial da fímbria P (LATHAM & STAMM, 1984).

2.3.4 Genes de virulência

As PAIs, descritas pela primeira vez por HACKER et al (1983), foram encontradas em uma região do DNA (> 30 kb) que está associada com organismos patogênicos e não são comumente encontrados no genoma de *E. coli* fecal. Em 2001 GUYER et al identificaram dois tipos de PAI: PAI I que carrega o “operon” para os genes *pap* e *hly* os quais codificam fímbria P e hemolisina, respectivamente, e PAI II que possui uma segunda cópia do operon

pap, genes envolvidos no transporte de ferro e os que codificam o auto-transporte e secreção de toxinas (BAUER et al, 2002).

Alguns genes encontrados nos PAIs são denominados de *pap* (pili associado a pielonefrite), *sfa* (adesina S fímbria) e *afa* (adesina afimbrial) os quais são transcritos em um único segmento de RNA mensageiro e regulados por um conjunto de seqüências comuns de DNA (um operon). Os operons são comumente encontrados, em sua maioria, codificando P ou F, S e *afa* (também designada Dr hemaglutinina) adesinas, respectivamente (BLANCO et al, 1997).

2.4- Antimicrobianos e suas Resistências

Em 1905 Paul Ehrlich demonstrou a possibilidade da síntese de certas substâncias capazes de danificar especificamente as células do microorganismo infectante, sem prejuízo para a saúde do hospedeiro. Ehrlich introduziu o conceito de índice quimioterápico – relação entre a dose máxima tolerada e a dose mínima curativa: o que propriamente caracteriza a quimioterapia é o emprego de substâncias dotadas de alto parasitotropismo e baixo organotropismo, portanto de índice quimioterápico elevado (BIER, 1985).

A quimioterapia antimicrobiana começou em 1935, com a descoberta das sulfonamidas. Em 1940, foi demonstrado que a penicilina, descoberta em 1929, poderia ser uma substância terapêutica eficaz. Durante os 25 anos seguintes as pesquisas de agentes quimioterápicos concentraram-se nas substâncias de origem microbiana, denominadas de antibióticos. O

isolamento, a concentração, a purificação e a produção da penicilina em grande escala foram sucedidos pelo desenvolvimento da estreptomicina, das tetraciclina, do cloranfenicol e de muitos outros agentes. Essas substâncias foram originalmente isoladas dos filtrados dos respectivos cultivos de bolores. Posteriormente, outros antibióticos foram sintetizados e, nesses últimos anos, a modificação biossintética das moléculas passou a constituir um método promissor na elaboração de agentes antimicrobianos novos (JAWETZ et al, 1998).

Antes que um antibiótico possa agir, ele deve interagir primeiro com alguma parte do microorganismo patogênico em um hospedeiro. A interação pode ser iniciada por um processo de transporte ativo específico da célula, que serve para aumentar a concentração intracelular “livre” do antibiótico, além daquela que seria atingida por difusão passiva. A concentração intracelular do antibiótico é determinada pelo equilíbrio entre influxo e efluxo, não havendo necessidade de ligação específica da droga a nenhum componente intracelular (JAWETZ et al, 1998).

Um dos grandes desafios na prática da medicina e cirurgia veterinária é a dificuldade no tratamento de infecções secundárias, quando estas são multirresistentes. O controle das infecções por *Escherichia coli* na medicina veterinária tem sido um problema, em especial devido à sua resistência múltipla aos antibióticos, isto é preocupante devido aos alimentos de origem animal e o contato cada vez mais próximo com animais de companhia (NOLAN et al., 1987). Vários estudos de resistência foram feitos em animais de produção (bovinos, suínos e aves), entretanto pouca consideração tem sido dada ao papel

desempenhado pelos pequenos animais, tais como cães e gatos na transferência de resistência de linhagens de origem animal para humano. Os pesquisadores WHITE *et al.*, demonstraram em 2002 que o nível de resistência antimicrobiana em cepas patogênicas vem aumentando com o passar do tempo. Os primeiros isolados clínicos de O157: H7 eram sensíveis a muitos antimicrobianos e a resistência a antibióticos era incomum nestes isolados. Uma vez que antimicrobianos não são utilizados para o tratamento de infecção por O157 em humanos, pode-se supor que o aumento desta resistência pode ser devido ao uso de antimicrobianos no gado, o qual é considerado um reservatório natural para a O157. Como um exemplo desse crescimento na resistência, em 1988 RATNAM *et al.* verificaram que apenas 2,9% de 174 cepas de *E.coli* O157 examinadas eram resistentes a um antimicrobiano. Mais recentemente MENG *et al.*, (1998) descreveram que 24,0 % das 125 cepas de *E.coli* O157 examinadas isoladas de animais, alimentos e humanos apresentavam resistência a, no mínimo, um antibiótico e 19,0% eram resistentes a três ou mais antimicrobianos.

Em 2002 PRESCOTT *et al* analisaram quinze anos de arquivos de um hospital-escola veterinário para determinar se a resistência a drogas antimicrobianas em *Staphylococcus spp.* isolados em cães aumentou, e se teve aumento nas espécies de bactérias isoladas do trato urinário de cães e notaram um aumento na multirresistência em *Enterococcus spp.* e um aumento marginal na incidência de *Enterobacter spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*, ambas bactérias antibiótico-resistentes. Chegaram à conclusão de que se deve evitar o uso indiscriminado de antibióticos no controle das infecções e que mais pesquisas são necessárias para esclarecer melhor o assunto.

Patógenos oportunistas multirresistentes são endêmicos em ambiente veterinário hospitalar. Cepas de *E. coli* resistentes a 12 antibióticos foram isolados de 2 cães internados na unidade de terapia intensiva com um intervalo de 48 horas um do outro. Uma revisão de 21 fichas do hospital com infecções por *E. coli* revelaram resistência a vários antibióticos, como por exemplo, a maioria das cefalosporinas, β -lactâmicos e ácido clavulânico, bem como resistência à tetraciclina, espectomicina, sulfonamidas, cloranfenicol e gentamicina. Segundo SANCHEZ et al (2002), várias cepas com diferentes padrões genéticos estão presentes em ambientes hospitalar.

A explicação de como o antibiótico atua, envolve um ou mais fenômenos biofísicos ou bioquímicos muito específicos, que ocorrem na bactéria. Para o sucesso da quimioterapia é preciso que o processo metabólico a ser atacado no microorganismo seja o mais diferente possível do hospedeiro, e que a lesão real que faz ou pode ser feita ao paciente pelo antimicrobiano deve ser avaliada em função do grau de risco para sua vida (YOUMANS et al, 1983).

O mecanismo de ação da maioria dos antimicrobianos não está totalmente elucidado. Todavia, esses mecanismos podem ocorrer através da inibição da síntese da parede celular, inibição da função da membrana celular, inibição da síntese de proteínas (inibição da tradução do material genético) ou inibição da síntese de ácidos nucléicos (JAWETZ et al, 1998).

O controle de ITU, por exemplo, é complicado devido ao aumento da incidência de cepas de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos comumente usados nos tratamentos (MANGES et al, 2001). Estudos indicam que esse

aumento de resistência é atribuído muitas vezes à utilização não criteriosa do antibiótico ou devido ao tratamento empírico (AHMED et al, 2000).

É alarmante que bactérias portando genes de resistência a antimicrobianos, patogênicas ou não patogênicos para os seres humanos, sejam selecionadas na microbiota intestinal dos animais e que contaminem os alimentos de origem animal e que transfiram sua resistência para outras bactérias da mesma espécie ou não no intestino humano (DONNELLY, *et al.*, 1996; PIDDOCK, 1996; BYWATER, *et al.*, 2004).

O surgimento e a disseminação de resistência a drogas antimicrobianas entre as bactérias é considerado um sério problema de saúde pública e o controle dessa disseminação como um desafio à ciência (COHEN, 2000). Uma pressão seletiva favorecendo os genótipos resistentes a antimicrobianos é exercida sempre que estas drogas são utilizadas de forma errônea, desnecessária ou terapêutica para o tratamento de infecções em Medicina veterinária e humana. Como uma consequência desta pressão seletiva, e devido ao uso indiscriminado destas drogas nas últimas décadas, ocorreu um aumento extraordinário do nível de resistência a agentes antimicrobianos apresentado pelas bactérias de origem humana ou animal (ANGULO, *et al.*, 2000; TEUBER, 2001; LEVY, 2002).

O nível de resistência apresentado pelas bactérias comensais foi proposto como um índice indicativo adequado para a avaliação da resistência a antimicrobianos apresentada pelas populações bacterianas, bem como um índice de avaliação da exposição destas bactérias às diferentes drogas antimicrobianas (Van den BOGAARD & STOBBERING, 2000; CAPRIOLI *et al.*,

2000). Além disso, a aquisição de resistência pelas bactérias comensais é motivo de preocupação porque a microbiota pode atuar como um reservatório potencial de genes de resistência a drogas antimicrobianas, as quais podem ser transferidas para uma bactéria patogênica dentro de um mesmo hospedeiro (SUMMERS, 2002).

2.4.1- Grupos de Antimicrobianos e suas Resistências

A resistência antimicrobiana é um problema muito complexo que envolve várias espécies bacterianas, mecanismos de resistência, transferência de resistência e a existência de reservatórios naturais de alguns tipos de bactérias. Vários estudos mostram que o uso de antimicrobianos em rações animais contribui para a seleção da resistência antimicrobiana e aumenta os riscos para os humanos porque é possível a transmissão de resistência de bactéria causadora de zoonose via cadeia alimentar (WEGENER et al, 1999). Bactérias resistentes podem ser adquiridas por humanos por outros caminhos alternativos como uma transmissão pessoa a pessoa, exposição ambiental e em contato direto com animais. Cães e gatos representam fontes potenciais de disseminação de genes de resistência antimicrobiana devido ao uso indiscriminado de agentes antimicrobianos nestes animais e seu íntimo contato com humanos (GUARDABASSI et al, 2004).

2.4.1.1 Betalactâmicos

Os betalactâmicos são compostos que contêm um núcleo básico comum, o anel betalactâmico. Todos os betalactâmicos atuam inibindo a síntese de parede celular bacteriana e, portanto, são ativos contra bactérias em crescimento. Esta inibição constitui apenas uma das atividades desses agentes, embora seja a mais compreendida. A etapa inicial na ação farmacológica consiste na ligação do fármaco aos receptores celulares (“proteínas de ligação da penicilina”, PBPs ou penicillin – binding proteins), logo a reação de transpeptidação é inibida, e a síntese de peptidoglicano é bloqueada. A próxima etapa provavelmente envolve a remoção ou inativação de um inibidor de enzimas autolíticas na parede celular. Isso ativa a enzima lítica e resulta em lise, se o ambiente for isotônico. Num meio acentuadamente hipertônico, as bactérias transformam-se em protoplastos ou esferoplastos, envolvidos apenas pela membrana celular. Existem vários tipos de PBPs e cada antibiótico pode ter especificidade maior por um ou vários tipos de PBP. Por atuarem na mesma membrana, porém em sítios diferentes, tais antibióticos, quando associados, podem demonstrar efeito aditivo. As PBPs estão sob controle cromossômico, e a ocorrência de mutações pode alterar seu número ou sua afinidade por fármacos betalactâmicos (JAWETZ et al, 1998).

São considerados betalactâmicos os seguintes antibióticos: penicilina (Ampicilina), cefalosporinas de primeira geração (cefalotina), segunda geração (cefuroxima e cefoxitina), terceira geração (cefotaxima, ceftriaxona,

ceftazidima), quarta geração (cefepina), monobactâmico (aztreonam) e carbapenem (imipenem).

A resistência a este grupo pode se dar por mutações cromossômicas das PBPs, por mutação dos canais de porina, levando a uma diminuição da permeabilidade da parede celular bacteriana ou pela produção de enzimas inativadoras do anel betalactâmico (PELCZAR Jr. et al, 1997).

2.4.1.2 Aminoglicosídeos

Quimicamente os aminoglicosídeos consistem em um amino-açúcar e em uma estrutura em forma de anel denominada aminociclitol (PELCZAR Jr. et al, 1997).

O mecanismo de ação dos aminoglicosídeos consiste em induzir a síntese anormal de proteínas que se dá através de quatro etapas: ligação do aminoglicosídeo a uma proteína específica da subunidade 30S do ribossomo microbiano, bloqueando a atividade do complexo de iniciação para a formação de peptídeos. Após isto a leitura pelo RNAm é feita equivocadamente resultando na formação de uma proteína não-funcional. Em sua última etapa a ligação do aminoglicosídeo resulta na quebra dos polissomas em monossomas incapazes de sintetizar proteínas. Estes eventos ocorrem levando a bactéria à morte (JAWETZ et al, 1998).

Como exemplo de aminoglicosídeos podemos citar: amicacina, gentamicina, tobramicina, estreptomicina, etc.

A resistência aos aminoglicosídeos quando de origem cromossômica está relacionada a uma perda ou alteração de uma proteína específica da subunidade 30S do ribossoma bacteriano (sítio de ligação em microorganismos susceptíveis). Uma outra forma de resistência consiste em um “defeito de permeabilidade”, reduzindo o transporte ativo da droga para o interior da célula, geralmente essa resistência é mediada por plasmídios. Além disso, bactérias gram negativas podem se tornar resistentes, devido a um plasmídio, produzindo enzimas (inativadoras) de adenilação, fosforilação ou acetilação, que destroem os fármacos (JAWETZ et al, 1998).

2.4.1.3 Tetraciclinas

As tetraciclinas são antibióticos de amplo espectro, que possuem um sistema de anel complexo. Formam um complexo insolúvel com diversos íons metálicos e o fato de possuírem interação com o cálcio e outros sais presentes na dieta levam a uma má absorção destes elementos quando utilizada por via oral (YOUMANS et al, 1983).

As tetraciclinas agem inibindo a síntese protéica em nível ribossômico podendo atuar tanto nos ribossomos bacterianos como de mamíferos, porém possuem ação mais intensa na subunidade 30S dos sistemas bacterianos. Por possuírem ação reversível e até inibida quando na remoção do fármaco, as tetraciclinas podem ser consideradas como bacteriostáticas (JAWETZ et al, 1998).

Mudanças na permeabilidade ao fármaco são as principais formas de resistência dos microorganismos, resultando em alterações na permeabilidade do envoltório celular microbiano. Em organismos resistentes, o fármaco não é transportado ativamente para o interior da célula, ou é rapidamente excluído antes que atinja concentrações inibidoras. De modo geral esta resistência é controlada por plasmídios (JAWETZ et al, 1998).

2.4.1.4 Quinolonas

As quinolonas surgiram na década de 60 com o uso do ácido nalidíxico, sendo amplamente utilizados, especialmente em infecções urinárias. Na década de 80 surgiram as fluorquinolonas (norfloxacina), com indicação limitada para infecções do trato urinário e gastrointestinais.

As quinolonas agem inibindo uma enzima chamada DNA-girase, que é responsável pelo superespirilamento do DNA bacteriano, para que o mesmo possa ser acomodado dentro da célula bacteriana em divisão. Assim, a falta dessa enzima faz com que o DNA fique alongado causando o rompimento da bactéria. Por este motivo podem ser consideradas drogas bactericidas (LOMAR & DIAMENT, 1998).

Mutações na formação da enzima DNA – girase ou diminuição na permeabilidade da parede celular são as principais formas de aquisição de resistência bacteriana às quinolonas (LOMAR & DIAMENT, 1998).

2.4.1.5 Sulfonamidas

O surgimento das sulfonamidas se deu na década de 30, sendo considerados os primeiros antimicrobianos eficazes. Todas possuem uma mesma estrutura central, que é importante, pois se assemelha à estrutura de um composto bioquímico natural denominado ácido para amino benzóico (PABA). Muitas bactérias requerem o PABA como um precursor do ácido tetraidrofólico (THFA), que é capaz de sintetizar aminoácidos e timina, um componente essencial ao DNA.

Por serem análogos estruturais do PABA, as enzimas bacterianas são muitas vezes “enganadas”. Isto resulta numa inibição competitiva da atividade da enzima, no caso a diidropteroato sintetase e por conseqüência o THFA não será produzido pela célula, assim as sulfonamidas podem ser consideradas compostos bacteriostáticos (JAWETZ et al, 1998).

Sua combinação com o trimetoprim produz um bloqueio seqüencial aumentando bastante o efeito bactericida. O trimetoprim é um agente antimicrobiano sintético análogo estrutural da porção pteridina do ácido diidrofólico (DHFA) e uma enzima bacteriana denominada diidrofolato redutase que pode ser facilmente enganada (PELCZAR Jr. et al, 1997).

Microorganismos se tornam resistentes às sulfonamidas quando desenvolvem uma via metabólica alternativa, que se desvia da reação inibida pelo fármaco.

Já no caso do trimetoprim os microorganismos resistentes elaboram uma enzima modificada que tem capacidade de desempenhar sua função

metabólica, embora seja menos afetada pelo fármaco do que a enzima no microorganismo susceptível (JAWETZ et al, 1998).

2. 4. 2- Origem da Resistência

A origem da resistência aos fármacos pode ser:

- **Origem não genética:** de um modo geral a replicação ativa das bactérias é necessária para a maioria das interferências dos agentes antibacterianos. Conseqüentemente, os microorganismos que estão metabolicamente inativos (sem multiplicação) podem ser fenotipicamente resistentes aos fármacos. Todavia, os descendentes são totalmente susceptíveis. Microorganismos podem perder a estrutura do alvo específico para um fármaco em várias gerações, tornando-se assim, resistentes.

- **Origem genética:** a grande maioria dos microorganismos resistentes a fármacos surge em conseqüência de alterações genéticas e processos subseqüentes de seleção pelos agentes antimicrobianos, podendo ser:

- Resistência cromossômica: desenvolve-se em conseqüência de mutação espontânea em um locus que controla a susceptibilidade a determinado agente antimicrobiano. A presença do antimicrobiano atua como mecanismo seletivo, suprimindo os microorganismos susceptíveis e permitindo o crescimento dos mutantes resistentes aos fármacos.

- Resistência extracromossômica: as bactérias quase sempre contêm elementos genéticos extracromossômicos denominados de plasmídios que

transportam genes para resistência a um ou, quase sempre, vários agentes antimicrobianos. Genes plasmidiais para a resistência antimicrobiana freqüentemente controlam a formação de enzimas destruidoras desses agentes antimicrobianos. O material genético e os plasmídios podem ser transferidos através da transdução, transformação, conjugação ou transposição (JAWETZ et al, 1998).

3- Objetivos

- Isolar e identificar cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães diarréicos.
- Determinar a resistência das cepas isoladas frente a vários antimicrobianos, inclusive testar multirresistência.
- Verificar a presença de cepas bacterianas com características de STEC.
- Verificar a presença de cepas bacterianas com características de ExPEC.

4- Materiais e Métodos

4.1 Coleta

Foram coletadas vinte e cinco amostras fecais utilizando-se swabs estéreis em cães diarréicos (atendidos em consultório veterinário na região de Ituverava-SP). Estes swabs foram transportados em meio Cary Blair e mantidos refrigerados em geladeira a 4 °C por no máximo uma semana, até sua sementeira em meio Mac Conkey, no qual foram feitos os isolamentos das colônias, de cada placa foram utilizadas quatro colônias. Cada cepa foi semeada e mantida em meio LB em geladeira a 4°C.



Figura 02- Placa contendo meio Mac Conkey

4.2 Isolamento e identificação

As amostras fecais foram semeadas por esgotamento em meio de cultura seletivo diferencial Mac Conkey e incubadas a 37° C por 24 horas. Foram submetidas à identificação quatro colônias por amostra. As colônias lactose positivas que apresentavam características presuntivas de *E. coli* eram submetidas aos testes bioquímicos confirmatórios: Indol, Glicose, Sacarose, Produção de gás, Lisina, Motilidade, Uréia, H₂S (valores obtidos utilizando-se o meio RUGAI modificado) e Citrato de Simons.

A semeadura no meio de Rugai modificado era realizada pela técnica de picada na base do meio, associada a técnica de estrias no ápice. Decorrido o tempo de incubação de aproximadamente 18 horas a 37 °C, eram realizadas as leituras e interpretação dos resultados, de acordo com a tabela de perfil bioquímico das enterobactérias, de forma que:

- A fermentação da glicose era observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. O aparecimento da cor amarela indica reação positiva e o não aparecimento indica a reação negativa.
- A fermentação da sacarose era observada entre o pico da inclinação até a base da mesma. O aparecimento da cor amarela indica reação positiva e o não aparecimento indica a reação negativa.

- A produção de gás era observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. O aparecimento de bolhas indica que a reação foi positiva e o não aparecimento indica reação negativa.
- A produção de H₂S era observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. O aparecimento da cor preta indica reação positiva e o não aparecimento indica a reação negativa.
- Uréia: Observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. O aparecimento da cor azul escuro a preto indica reação positiva e o meio inalterado indica a reação negativa.
- Lisina: Observada na fase inferior. O aparecimento da cor púrpura indica que a reação foi positiva e o aparecimento da cor amarela indica que a reação foi negativa.
- Indol: observada na base da tampa de algodão. O aparecimento da cor vermelha indica reação positiva e o não aparecimento indica reação negativa.
- Motilidade: Observada na fase inferior. Na reação positiva o meio irá se apresentar turvo e na reação negativa o meio fica inalterado.



Figura 03 – Tubos contendo meio Rugai modificado, com amostras positiva para *E. coli* (superior) e negativa (inferior).

O meio citrato é vertido em tubo com agar. Fazem-se estrias sobre a superfície inclinada do agar, com um inóculo escasso. A produção de uma cor azul no meio, após 24 horas de incubação a 37°C, indica a presença de produtos alcalinos e uma prova de utilização de citratase positiva. (EDWARDS & EWING, 1972).

Citrato de Simmons (Simmons Citrate Agar) - DIFCO

Composição: Formulação (g/l) - pH final: 6,8

Sulfato de magnésio.....	0,20
Fosfato de amônio monobásico.....	1,00
Fosfato dipotássico.....	1,00
Citrato de sódio.....	2,00
Cloreto de sódio.....	5,00

Agar.....	15,00
Azul de bromotimol	0,08

Segundo as instruções do fabricante, 24,2g do meio de cultura foram reidratados em 1000 ml de água destilada e levados a fervura para dissolução completa, em seguida o meio foi distribuído em tubos de vidro de 12 X 100 mm e esterilizado a 121 °C por 20 minutos. Após isto colocar os tubos na posição inclinada para sua solidificação.

Para uma identificação com maior precisão, foram utilizados controles positivos a partir de cepas de *E. coli* padrões.

4.3 Manutenção das amostras

Após a conclusão do isolamento, cada uma das amostras obtidas foi mantida de duas maneiras:

- Através do repique semanal em placas de Petri ou quinzenal em tubo de agar inclinado, sempre em meio LB (Luria Bertani) e conservadas a 4 °C em geladeira.
- Em freezer a -20 °C em tubos de plástico de microcentrífuga contendo glicerol 15% e crescimento bacteriano em LB líquido.

LB meio - Luria Bertani (Luria Bertani Medium) - DIFCO

Composição: Formulação (g/l) pH final: 7,0

Triptona.....	10,00
Extrato de levedura.....	5,00
Cloreto de sódio.....	10,00

Os produtos acima foram diluídos em 1000 ml de água destilada, levados a fervura para dissolução completa e autoclavados a 121 °C por 20 minutos. Para utilização em placa foi acrescentado 20,0g de agar, para utilização em tubo o meio foi distribuído em tubos de vidro de 12 X 100 mm em um volume aproximado de 3,0 ml. O meio foi testado quanto a sua esterilidade sendo colocado na estufa a 37°C por 24 horas (SAMBROOK et al, 1989).

LB semi-sólido

Composição: Formulação (g/l)

Triptona.....	10,00
Extrato de levedura.....	5,00
Cloreto de sódio.....	10,00
Agar.....	4,00

Os componentes foram todos diluídos em 1000ml de água destilada, misturada ate a completa homogeneização, em seguida foi distribuída em tubos de vidro de 18 X 200 mm um volume de 4,0 ml e autoclavado a 121 °C por 20 minutos.

4.4 Sensibilidade a antimicrobianos

Para a realização do teste de sensibilidade das cepas de *E.coli* aos antibióticos foi utilizado o método de difusão em disco, o qual proporciona uma avaliação qualitativa da sensibilidade (BAUER et al, 1966).

Após a obtenção de colônias jovens foram inoculadas em 2mL de infusão cérebro-coração (BHI) e colocadas em estufa a 37^o C até obter na escala de turvação, segundo McFarland, 0,5 de densidade (ORDEN *et al.*, 2000). A seguir, as culturas obtidas foram semeadas com o auxílio de *swabs* estéreis, em placas contendo agar Mueller-Hinton e, após aproximadamente 3 minutos, tempo necessário para a secagem da superfície do meio, foram colocados assepticamente, os discos (Laborclin) contendo os antimicrobianos de forma equidistante. A leitura foi realizada após 18 a 24 horas de incubação com uma régua milimetrada. (BAUER *et al.*, 1966; ORDEN *et al.*, 2000). Os diâmetros obtidos em milímetros foram comparados com tabela fornecida pelo fabricante dos discos utilizados.

Os antimicrobianos testados foram: ácido nalidíxico (NAL, 30µg), amicacina (AMI, 30µg), amoxicilina (AMO, 10µg), amoxicilina + ácido clavulânico (AMC, 30µg), ampicilina (AMP, 10µg), cefalotina (CFL, 30µg), ceftriaxona (CRO, 30µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg), cotrimoxazol (SUT, 25µg), estreptomicina (EST, 10µg), gentamicina (GEN, 10µg) e tetraciclina (TET, 30µg).

Agar Müller-Hinton – OXOID

Composição: Formulação (g/l)

Infusão desidratada de carne.....	300,00
Hidrolisado de caseína.....	17,50
Amido.....	1,50
Agar.....	17,00

Segundo as instruções do fabricante, 38 g do meio de cultura foi dissolvido em 1000 ml de água destilada e levado a fervura para dissolução completa, a seguir o meio foi esterilizado e autoclavado a 121 °C por 20 minutos.

Caldo Infuso de Cérebro e Coração (Brain Heart Infusion – BHI) – DIFCO

Composição: Formulação (g/l)

Infusão de cérebro bovino.....	200,00
Infusão de coração bovino.....	250,00
Proteose peptona.....	10,00
Bacto-dextrose.....	2,00
Cloreto de sódio.....	5,00
Fosfato dissódico.....	2,50

Segundo as instruções do fabricante, 52g do meio de cultura foram reidratados com 1000 ml com água destilada e levada a fervura para dissolução completa do meio, a seguir foram distribuídos aproximadamente 3,0 ml em tubos de vidro de 12 X 100 mm e autoclavado a 121 °C por 20 minutos.

O meio foi testado quanto a sua esterilidade sendo colocado na estufa a 37 °C por 24 horas antes de sua utilização.



Figura 04 – Placa de antibiograma contendo 12 discos de antimicrobianos.

4.5 Testes Utilizados para Pesquisa de Fatores de Virulência em *E.coli*

4.5.1 Produção de Hemolisina

A capacidade hemolítica das cepas foi testada semeando-se as amostras, com auxílio de uma alça de platina de semeadura pela técnica de picada, em placas de Petri contendo agar Müeller-Hinton contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado (gentilmente cedido pelo biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP), onde após incubação a 37°C por 24 horas a produção de

hemolisina foi verificada pela presença de um halo de hemólise ao redor das colônias (WATANABE et al, 1988; MOBLEY et al, 1990).

Agar sangue

Composição:

Agar Müller-Hinton q.s.p.....	100,00ml
Sangue desfibrinado q.s.p.....	5,00 ml

Antes da obtenção do agar sangue foi preparado a sua base (agar Müller-Hinton), a qual após, autoclavada e alíquotada foi resfriada a uma temperatura aproximada de 40 a 50 °C e adicionada assepticamente o sangue desfibrinado com o auxílio de uma pipeta estéril. Foi misturada cuidadosamente o sangue e a base, evitando-se a formação de espuma. O meio foi distribuído em placas de Petri previamente esterilizadas de 15 X 90 mm, em alíquotas de cerca de 20 ml. Após solidificação as placas com o meio de cultura foram testadas quanto à sua esterilidade sendo colocadas em estufa a 37 °C por 24 horas e logo em seguida utilizadas ou estocadas em geladeira a 4 °C por até 7 dias.

4.5.2 Teste da Hemaglutinação

As amostras foram examinadas quanto a presença de hemaglutininas sensíveis ou resistentes a manose por uma técnica de aglutinação em lâmina (MINSHEW et al, 1978; LATHAM & STAMM, 1984).

Para este teste foram utilizados 2 tipos de hemácias :

- ◆ Humana: do tipo sanguíneo 0 ,P₁ positiva (gentilmente cedida pela Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto - FUNDHERP), coletadas em 3,8% de citrato de sódio, lavadas 3 vezes em PBS (solução tampão) e ressuspensa em PBS numa concentração de 3%.
- ◆ Cobaio: (gentilmente cedida pelo biotério da FMRP), coletadas em solução de EDTA, lavadas em PBS e resuspensa em PBS numa concentração de 1%.

As hemácias foram colocadas em um frasco estéril e conservadas em geladeira a 4 °C.

As amostras a serem testadas foram previamente semeadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 37 °C por 24 horas para posteriormente serem utilizadas no teste de hemaglutinação.

Para realização do teste foi colocado em uma lâmina: 1 gota da hemácia humana a 3% em PBS, 1 gota da suspensão bacteriana previamente crescida em caldo BHI e 1 gota de PBS com 2% de manose. Com auxílio de um palito de madeira estéril as soluções foram misturadas e a seguir a lâmina foi agitada manualmente por aproximadamente 60 segundos. As cepas de *E.coli* que aglutinaram os eritrócitos humanos na presença de manose foram denominadas de manose resistente (HAMR) e são consideradas possuidoras de fímbria P.

Em outra lâmina foi colocada 1 gota da hemácia de cobaio a 1% em PBS, 1 gota da suspensão bacteriana crescida em caldo BHI e 1 gota de PBS com e sem manose a 2%, com auxílio de um palito de madeira estéril as soluções foram misturadas a seguir a lâmina foi agitada manualmente por aproximadamente 60

segundos. As amostras de *E.coli* que não aglutinaram os eritrócitos de cobaio na presença de manose foram denominadas de manose sensível (HAMS) e são consideradas possuidoras de fímbria tipo 1.

PBS (Phosphate Buffered Saline) - Solução Tampão

Composição: Formulação (g/l) - pH final: 7,5

NaCl.....	8,00
KCl.....	0,20
KH ₂ PO ₄	0,20
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	2,90

Os componentes foram adicionados a 1000 ml de água destilada a seguir a solução foi autoclavada a 121 °C por 20 minutos (BIER, 1985).

Manose 2%

Composição:

D-manose.....	2,00 g
PBS.....	100,00 ml

Após o PBS ser autoclavado, foi retirada uma alíquota de 100,00 ml e misturada com 2,00g de D-manose, após total homogenização a solução foi estocada em frascos de vidro para posterior utilização.

4.5.3 Produção de Aerobactina

As amostras foram previamente semeadas em placas de Petri contendo meio LB e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, com o auxílio de um palito de madeira esterilizado (a fim de se evitar a presença de ferro), colônias foram retiradas do meio e transferidas para um tubo de vidro de 12 X 100 mm contendo 3,00 ml de caldo LB.

No caldo LB foi obtido o crescimento das amostras após a incubação por 24 horas a 37° C. A seguir foi preparado o meio M9 contendo biperidina (1,30 ml de M9 e 80µl de biperidina foram colocados em um tubo de vidro de 12 X 100 mm e levados a estufa a 37 °C por 30 minutos para ocorrer a quelação do ferro). Após este prazo esta solução foi misturada a 20 ml de agar a 2 % e distribuída em placa de Petri estéril. Após a solidificação do meio foram inoculadas, com o auxílio de uma pipeta automática, as amostras que cresceram previamente no caldo LB. A placa foi incubada a 37 °C por 24 horas, esta etapa da prova é chamada de indução. Após ter promovido a indução, foi preparada uma nova placa de M9 com biperidina, usando o mesmo procedimento citado acima, porém no final dos 30 minutos de incubação foi adicionado 0,1 ml da suspensão de *E. coli* indicadora LG 1522, previamente crescida em caldo LB, e foram acrescentados 20 ml de agar 2%. Após a solidificação da placa foram semeadas as amostras já induzidas (retiradas da placa de indução), com o auxílio de um palito de madeira estéril. Após a inoculação a placa foi incubada a 37°C por 24 horas. Após este período foi realizada a leitura do teste o qual foi considerado positivo para aerobactina

quando ocorre o crescimento da LG 1522 ao redor das amostras inoculadas. Foi utilizado, em todas as placas testadas, o controle positivo de *E. coli* LG 1315 (CARBONETTI & WILLIAMS, 1984; VALVANO et al, 1986).

Bipiridina – 50 mM (Solução estoque)

Diluyente álcool etílico Merck.....	100,00 ml
Bipiridina.....	0,78 g

Glicose 20% (Solução estoque)

Composição: Formulação (P/V)

Glicose.....	20,00 g
Água Milli Q.....	100,00 ml

Após misturar os 2 componentes, a solução foi filtrada para esterilizá-la usando-se membrana Millipori (0,22 μ m).

Glicose 0,2 % (Solução uso)

Foi preparada a partir da glicose 20%, onde 1 ml da solução glicose 20 % foi misturada a 100 ml de água Milli Q, e posteriormente filtrada para esterilizá-la com membrana Millipori.

Tiamina (Solução estoque)

Composição: Formulação (P/V)

Tiamina.....0,10 g

Água Milli Q.....100,00 ml

Após misturar os dois componentes a solução foi filtrada para esterilização, utilizando-se membrana Millipori.

Tiamina (Solução uso)

Da solução acima preparada foram retirados 5 μ l, os quais foram dissolvidos em 20,00 ml de água Milli Q autoclavada.

Triptofano (Solução estoque)

Composição: Formulação (P/V)

Triptofano.....0,10 g

Água Milli Q.....10,00 ml

Após misturar os dois componentes acima a solução foi filtrada para esterilização utilizando-se membrana Millipori.

Triptofano (Solução uso)

Da solução acima preparada foram retiradas 2 µl e dissolvidas em 8,0 ml de água Milli Q autoclavada.

Agar 2 %

Composição: Formulação (P/V)

Agar.....	2,00 g
Água Milli Q.....	100,0 ml

Dissolver bem os componentes, distribuir 20,00 ml em tubos de vidro 18 X 200 mm e autoclavar a 121 °C por 20 minutos.

Meio Mínimo M9 (20 X concentrado)

Composição: Formulação (P/V) pH final: 7,4

Na ₂ HPO ₄	20,00 g
KH ₂ PO ₄	12,00 g
NaCl.....	2,00 g
NH ₄ Cl.....	4,00 g
Casaminoácido.....	20,00 g
Água Milli Q (q.s.p.).....	200,00 ml

Após a dissolução dos componentes, o meio foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Posteriormente a autoclavação foram acrescentados ao meio 40,00 ml de glicose 0,2%, 20,00 ml de tiamina e 8,00 ml de triptofano (após acrescentar os aminoácidos no meio M9 a concentração do meio passou de 20 para 15 X concentrado e após a adição do agar ficou 1 X concentrado).

4.6 DNA Bacteriano

4.6.1 Preparação para amplificação

A obtenção do DNA bacteriano foi realizada em *E. coli* por fervura em banho-maria.

A bactéria foi cultivada em caldo LB por 18 horas a 37°C, a seguir 1ml desta cultura foi centrifugada a 12.000 rpm por 30 segundos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuscitado em 200µl de água Milli Q autoclavada. A centrifugação e a ressuspensão foram novamente realizadas e por último o precipitado é ressuscitado em 200µl de água Milli Q. O tubo foi incubado por 10 minutos a 100°C, para que ocorresse a lise da parede celular. Após a centrifugação do lisado (12.000 rpm por 10 segundos), 150 µl do sobrenadante foi estocado a -20°C como estoque de DNA molde (DNA Template) (KESKIMAKI et al, 2001).

4.6.2 Amplificação através da técnica de PCR

A determinação dos genes de virulência *stx 1*, *stx 2* e *eae* foram realizadas conforme CHINA et al (1996) e a seqüência de bases (primers) e o tamanho dos segmentos específicos dos genes *stx 1*, *stx 2* e *eae* amplificados estão apresentados na Tabela 1. Os primers utilizados foram adquiridos da IDT (Integrated DNA Technologies, Inc). A amplificação do DNA bacteriano foi realizada em 50 µl contendo 10µl de amostra do sobrenadante, 1,5 µl de cada primer, 0,2 mM (cada) dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM Mg Cl₂, 50 mM KCl e 2,5 U de Taq polimerase (Biotol). Esta mistura foi submetida a um termociclador (Eppendorf Mastercycler) a 94 °C por 5 minutos (desnaturação) seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto (desnaturação), 55 °C por 1 minuto (anelamento) e 72 °C por 1 minuto (extensão). No último ciclo a última fase foi realizada por um tempo maior (10 minutos) para completa extensão pela Taq polimerase.

Tabela 1 Primers usados na PCR para amplificação dos fragmentos específicos dos genes *stx 1*, *stx 2* e *eae*.

Primers	Seqüência de nucleotídeos	Tamanho do produto de amplificação (pb)
eae B52	AGGCTTCGTCACAGTTG	570
eae B53	CCATCGTCACCAGAGGA	
stx1 B54	AGAGCGATGTTACGGTTTG	388
stx1 B55	TTGCCCCAGAGTGGATG	
stx2 B56	TGGGTTTTTCTTCGGTATC	807
stx2 B57	GACATTCTGGTTGACTCTCTT	

Foram utilizados três jogos de primers sintetizados pela Invitrogen, cada um dos jogos de primers foi utilizado para amplificação de um dos três operons fimbriais estudados, *pap*, *afa*, *sfa*. O PCR foi realizado em um volume de 50 µl contendo 10 µl do DNA template, 0,5µM de cada um dos primers, 200 µM de cada um dos quatro deoxinucleotídeo trifosfato, 10 mM Tris HCl (pH 8,3) 1,5 M Mg Cl₂ e 2U de Taq polimerase (Biotol). A amplificação por PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação de 94 °C por 5 minutos seguido por 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, anelamento a 65 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2 minutos e um ciclo final de extensão a 72 °C por 10 minutos. Segundo o protocolo estabelecido por LE BOUGUENEC et al (1992).

Após um dos dois processos de amplificação 10µl da mistura de amplificação foram analisados por eletroforese em um gel de agarose de 1,5%, e os produtos da reação foram visualizados após marcação com brometo de etídeo. Um controle da reação (branco) o qual continha todos os componentes da mistura de reação exceto o DNA molde foi incluído em cada reação de PCR.

Tabela 2 Primers usados na PCR para amplificação dos fragmentos específicos dos genes *pap*, *sfa*, *afa*.

Primer	Seqüência de nucleotídeos	Tamanho do produto de amplificação (pb)
pap 1	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	328
pap 2	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	
sfa 1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410
sfa 2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	
afa 1	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC	750
afa 2	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	

5- Resultados

5.1 Origem das amostras

As amostras fecais dos 25 cães diarréicos permitiram o isolamento de 92 cepas de *E. coli*, sendo que 45 % das cepas foram obtidas a partir de cães machos e 55 % a partir de fêmeas. Foi feita também uma diferenciação de acordo com a idade, sendo que foi notada uma maior porcentagem de cães com até 1 ano de idade (67 %), seguido por cães com idade entre 2 e 8 anos (20 %) e menor porcentagem de cães com mais de 8 anos de idade (13 %). Foi observado também que o maior número de amostras foi obtida a partir de cadelas jovens (43 %), e menor número em fêmeas adultas e de machos senis (4% cada). (Figura 05)

Não foram notadas diferenças entre as diferentes raças dos cães diarréicos com relação a estes portarem cepas de *E. coli*.

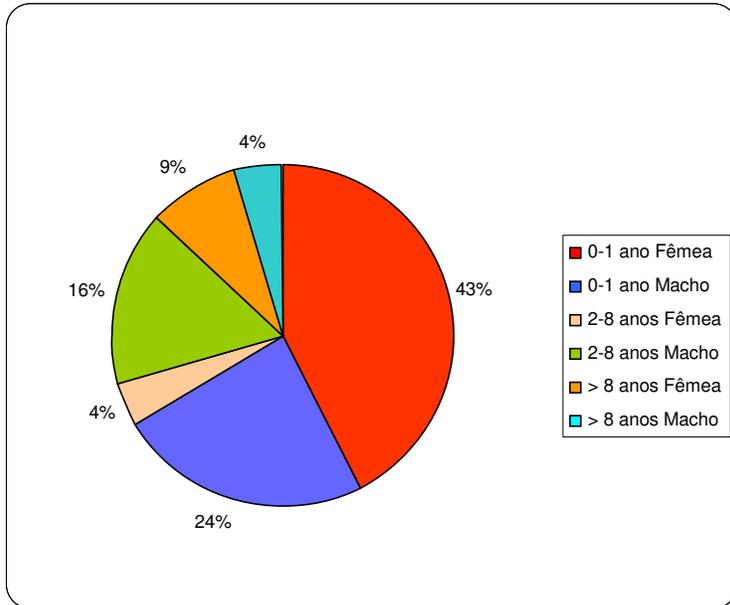


Figura 05 . Porcentagem de cães machos e fêmeas, individualizados de acordo com suas respectivas idades.

5.2 Resistência antimicrobiana

Foram realizados testes de antimicrobianos pelo método de disco com antimicrobiano. De uma forma geral foram observadas altas resistências a antimicrobianos (Figura 06), inclusive várias cepas multirresistentes aos antimicrobianos testados. As maiores resistências foram notadas para estreptomicina (86,97%), cefalotina (71,75%) e gentamicina (63,05%) e menores resistências foram notadas para ceftriaxona (4,34 %) e amoxicilina / ácido clavulônico (21,74 %). Tabela 01.

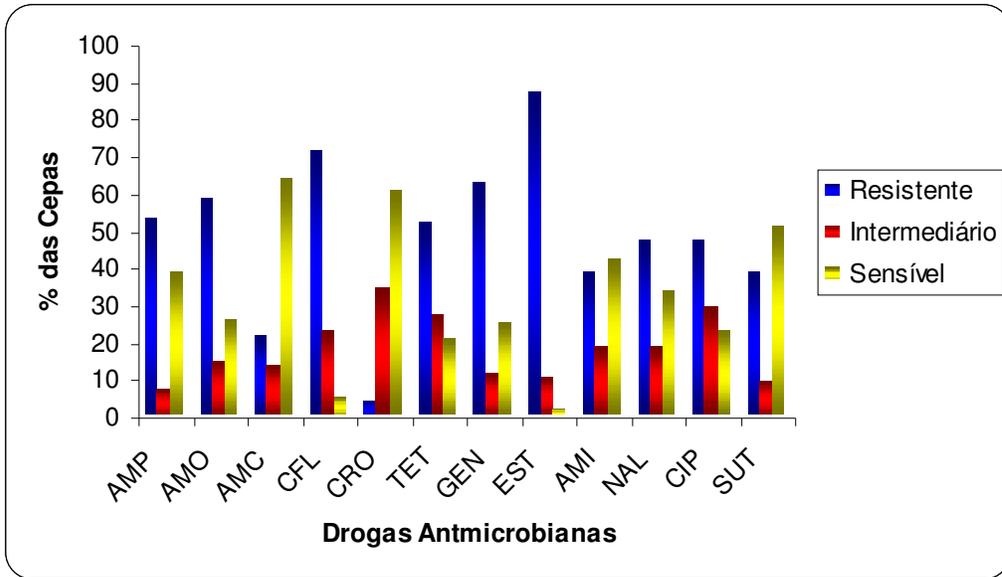


Figura 06. Susceptibilidade antimicrobiana das 92 cepas de *E. coli* isoladas de cães diarreicos em Ituverava, SP, BR.

Tabela 03. Teste de susceptibilidade antimicrobiana de 92 cepas de *E.coli* isoladas de cães diarreicos em Ituverava, SP, BR.

Drogas antimicrobianas	Fenótipo- Porcentagem		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Ampicilina	53,26	7,61	39,13
Amoxicilina	58,71	15,21	26,08
Amoxicilina/ácido clavulânico	21,74	14,13	64,13
Cefalotina	71,75	22,82	5,43
Ceftriaxona	4,34	34,78	60,88
Tetraciclina	52,17	27,17	20,66
Gentamicina	63,05	11,95	25,00
Estreptomicina	86,97	10,86	2,17
Amicacina	39,14	18,47	42,39
Ácido nalidíxico	47,84	18,47	33,69
Ciprofloxacina	47,84	29,34	22,82
Cotrimoxazol	39,14	9,78	51,08

Analisando as 92 cepas de *E. coli* observou-se que, 68 destas eram multirresistentes aos antimicrobianos testados, sendo que o maior número de cepas foram multirresistentes a 5 (12 cepas), 6 (11 cepas) e 7 (13 cepas) e nenhuma cepa foi multirresistente a 11 e 12 antimicrobianos. Figura 07

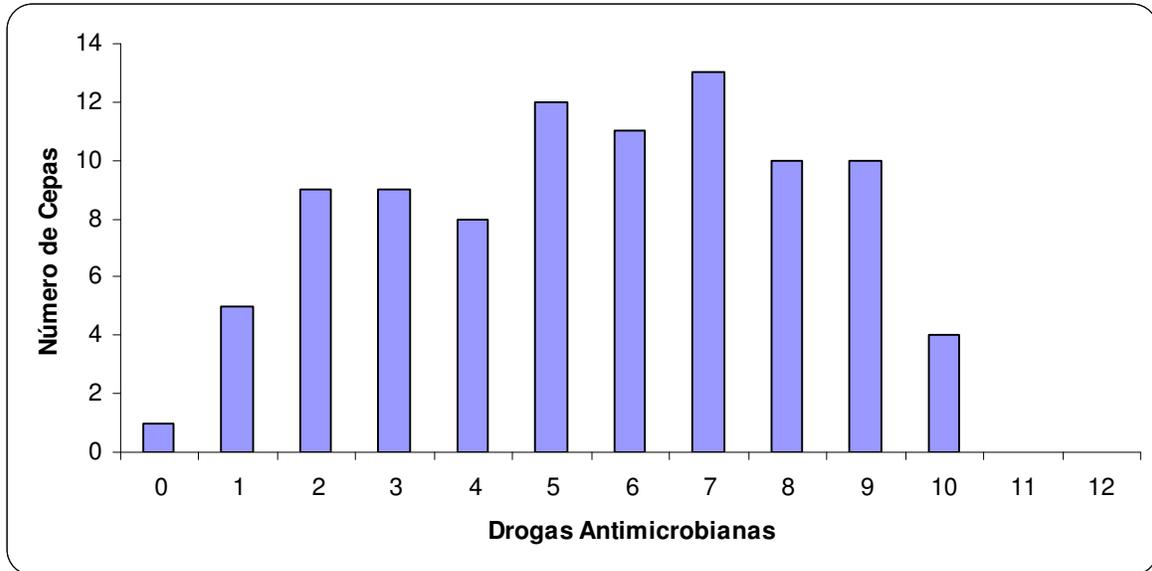


Figura 07 - Distribuição da multiresistência para 12 agentes antimicrobianos entre 92 cepas de *E. coli* isoladas de cães diarreicos na cidade de Ituverava, estado de São Paulo, Brasil.

Tabela 04 – Distribuição dos fenótipos mais freqüentes de cepas de *Escherichia coli* isoladas de cachorros diarreicos, apresentando multiresistência a drogas antimicrobianas.

Fenótipo	Número de cepas
AMO-CFL-TET-EST-NAL	2
AMP-AMO-TET-EST-NAL-CIP	2
AMP-AMO-CFL-GEN-EST-SUT	2
CFL-TET-GEN-EST-AMI-NAL-CIP	2
AMP-AMO-AMC-CFL-CRO-TET-EST	2
AMP-AMO-CFL-GEN-EST -NAL -SUT	2
AMP-AMO-CFL-GEN-EST-AMI-NAL-SUT	2
AMP-AMO-CFL-TET-GEN-EST-NAL-SUT	5
AMP-AMO-CFL-TET-GEN-EST-AMI-NAL-CIP	2
AMP-AMO-CFL-CRO-TET-GEN-EST-AMI-SUT	2
AMP-AMO-AMC-CFL-TET-GEN-EST-AMI-NAL-CIP	2
AMP-AMO-AMC-CFL-CRO-TET-GEN-EST-NAL-SUT	2

5.3 *Escherichia coli* shiga-toxigênica

Das 92 cepas estudadas, 21 podem ser classificadas como STEC (*Escherichia coli* Shiga-toxina) por possuírem como fator de virulência os genes *stx* 1 (7 cepas), *stx* 2 (5 cepas) ou *eae* (9 cepas). Foi feita, também a comparação destas com a presença da alfa hemolisina e notou-se que 2 das 7 amostras que possuíam o gene *stx* 1 foram positivas para alfa hemolisina, todas que possuíam *stx* 2 produziam alfa hemolisina e seis das nove que possuíam o gene *eae* foram positivos quando pesquisadas para alfa hemolisina. Tabela 4. Figuras 8 e 9.

As 21 cepas positivas para STEC foram verificadas, separadamente das demais amostras, sendo que em relação a sensibilidade aos 12 antimicrobianos testados, notou-se maior resistência à cefalotina (85,7%) e à estreptomicina (81,0%) e maior sensibilidade à amoxicilina / ácido clavulônico (76,0%) e à ceftriaxona (66,7%) . Tabela 5

Tabela 5. Perfil dos genes de virulência de *Escherichia coli* isolados de vinte e cinco cães diarréicos (92 isolados) em Ituverava, estado de São Paulo, Brasil entre Janeiro e Dezembro de 2006.

Fator de Virulência	Número de Isolados (%)	α- hemolisina
		Isolados Positivos/Total
<i>stx</i> 1	7 (7,6)	2/7
<i>stx</i> 2	5 (5,4)	5/5
Eae	9 (9,8)	6/9
Total	21	13/21

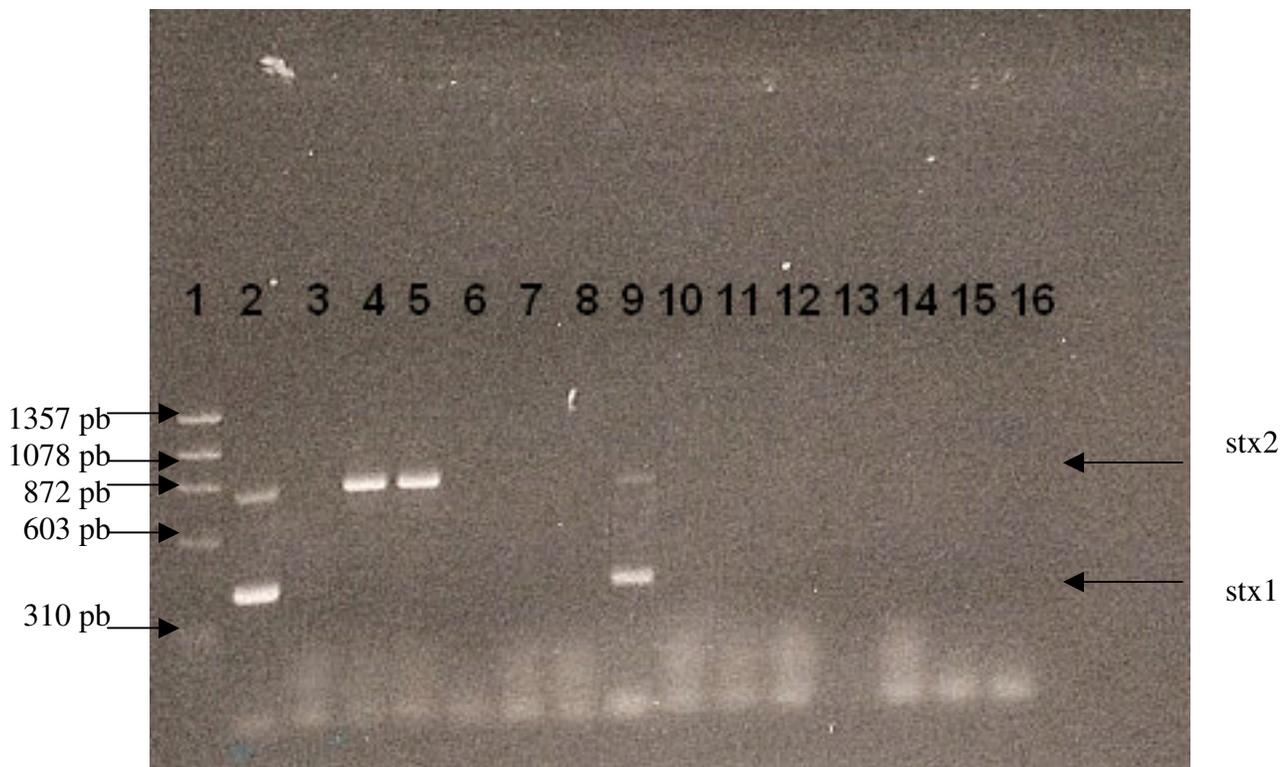


Figura 08 – Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado a esquerda. Canaleta 1: marcador de peso molecular Φ X174 RFDNA – digestão com Hae III; Canaleta 2: controle positivo stx1 + e stx2 +; Canaleta 3: cepa 35-1; Canaleta 4: cepa 47-3; Canaleta 5: cepa 48-3; Canaleta 6: cepa 35-3; Canaleta 7: cepa 30-1; Canaleta 8: cepa 36-1; Canaleta 9: controle positivo stx1 + e stx2 +; Canaleta 10: cepa 37-1; Canaleta 11: cepa 19-1; Canaleta 12: cepa 33-2; Canaleta 13: cepa 33-3; Canaleta 14: cepa 31-2; Canaleta 15: cepa 38-2; Canaleta 16: cepa 38-4.

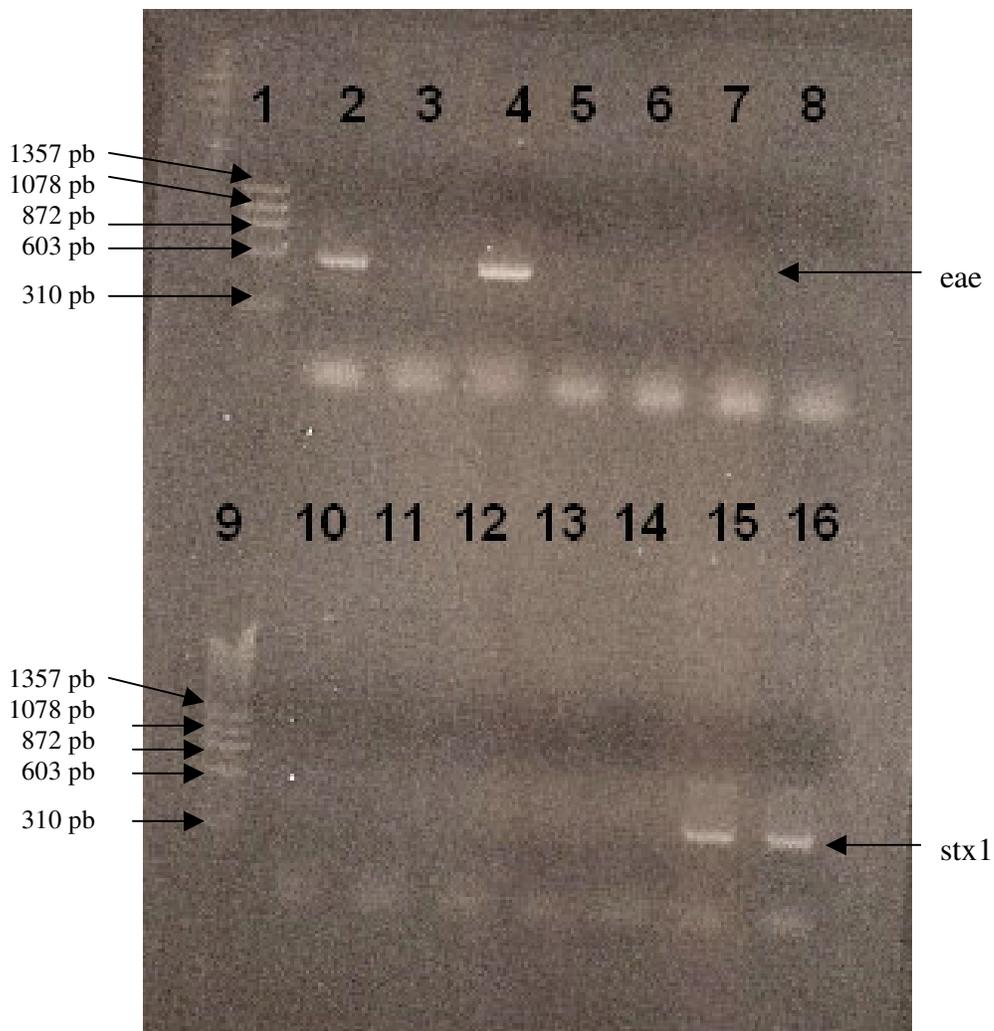


Figura 09– Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado a esquerda. Canaleta 1: marcador de peso molecular Φ X174 RFDNA – digestão com Hae III; Canaleta 2: controle positivo eae +; Canaleta 3: cepa 10-2; Canaleta 4: cepa 18-2; Canaleta 5: cepa 10-4; Canaleta 6: cepa 18-1; Canaleta 7: cepa 19-2; Canaleta 8: cepa 27-1; Canaleta 9: cepa 27-2; Canaleta 10: cepa 27-3; Canaleta 11: cepa 27-4; Canaleta 12: cepa 30-1; Canaleta 13: cepa 30-2; Canaleta 14: cepa 31-3; Canaleta 15: cepa 51-3; Canaleta 16: controle positivo stx1 +.

Tabela 06. Teste de susceptibilidade antimicrobiana de 21 cepas de *E. coli* portadoras dos genes *stx* ou *eae* (fatores de virulência) isoladas de cães diarréicos em Ituverava, SP, BR.

Drogas antimicrobianas	Fenótipo- Porcentagem		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Ampicilina	71,4	4,8	23,8
Amoxicilina	71,4	19,0	9,6
Amoxicilina/Ácido	14,4	9,6	76,0
Clavulânico			
Cefalotina	85,7	14,3	0,0
Ceftriaxona	0,0	33,3	66,7
Tetraciclina	38,2	28,5	33,3
Gentamicina	71,4	9,6	19,0
Estreptomicina	81,0	14,2	4,8
Amicacina	28,5	19,2	52,3
Ácido nalidíxico	23,8	38,1	38,1
Ciprofloxacina	19,2	28,5	52,3
Cotrimoxazol	38,2	28,5	33,3

5.4 *Escherichia coli* extraintestinal

Para a confirmação de cepas de *E. coli* como ExPEC é necessária a confirmação de pelo menos dois fatores de virulência para sua caracterização, assim os fatores de virulência estudados estão apresentados na Tabela 6. Das 92 cepas estudadas 11 possuíam o gene *pap* e uma o gene *sfa*, genes estes

que fazem parte da identificação das ExPEC, por serem genes de virulência. Foi estudada a capacidade das cepas em produzir hemolisinas do tipo alfa e beta. 32 das 92 cepas foram positivas para β -hemolisina e 48 para α -hemolisina. Foi pesquisada também a presença de adesinas por meio de hemaglutinação, e se detectou a presença de fímbrias do tipo I (33 amostras) e fímbria P (51 amostras). Como prova comprobatória de algumas cepas como ExPEC foi feito o teste de aerobactina, que mostrou um resultado positivo para seis amostras, dentre as 12 que possuíam os genes *pap* e *sfa*. Os resultados obtidos permitiram demonstrar que 10 das cepas apresentavam 2 ou mais características típicas de ExPEC, e que portanto puderam ser classificadas como ExPEC. Figura 10.

Tabela 07 – Fatores de virulência característicos de ExPEC detectados nas 92 cepas de *E. coli* isolados de cães diarreicos.

Fator de virulência	Número de cepas	(% do total)
A-hemolisina	48	52,1
B-hemolisina	32	34,7
Fímbria tipo I	33	35,8
Fímbria P	51	55,4
Aerobactina	6	6,5
Pap	11	12,0
Sfa	1	1,0
Afã	0	0,0

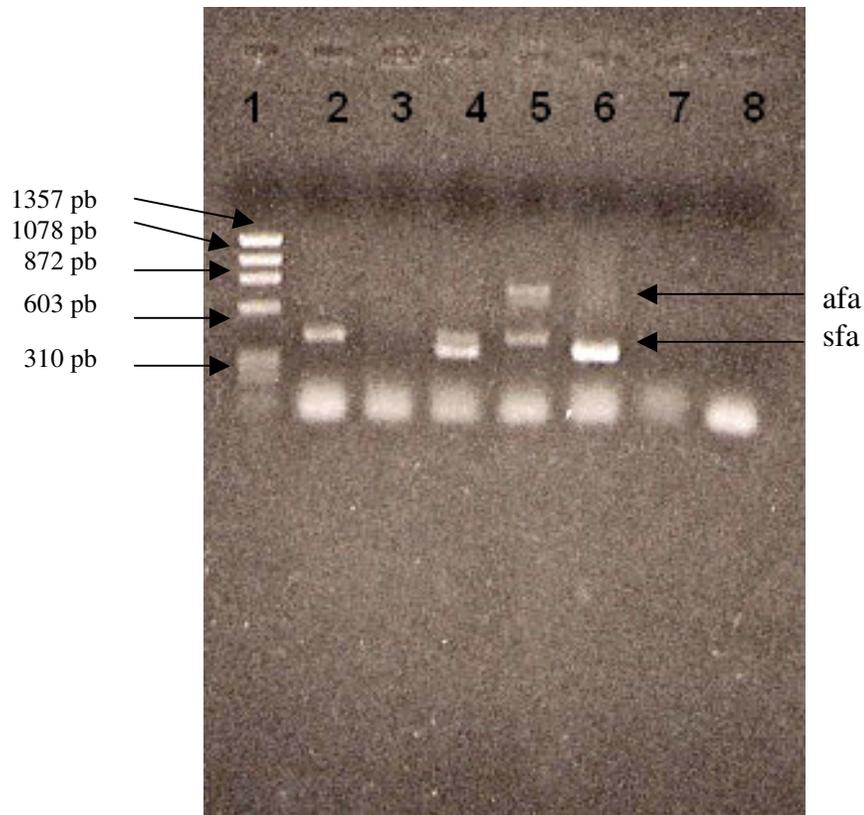


Figura 10– Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação de polimerase (PCR). O tamanho dos produtos de amplificação está mostrado a esquerda. Canaleta 1: marcador de peso molecular Φ X174 RFDNA – digestão com Hae III; Canaleta 2: controle positivo sfa +; Canaleta 3: cepa negativa; Canaleta 4: cepa 50.3 sfa + pap +; Canaleta 5: controle positivo sfa + pap +; Canaleta 6: cepa 50-4 pap +; Canaleta 7: cepa 19-2; Canaleta 8: Branco da reação.

Verificando as sensibilidades das cepas ExPEC notou-se que todas as seis cepas foram resistentes à estreptomicina e 66,7 % ao ácido nalidíxico. As maiores sensibilidades foram observadas para o ciprofloxacina e o cotrimoxazol com 83,3 % cada. Tabela 7.

Tabela 08. Teste de susceptibilidade antimicrobiana das 6 cepas de *E. coli* extraintestinais isoladas de cães diarreicos em Ituverava, SP, BR.

Drogas antimicrobianas	Fenótipo- Porcentagem		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Ampicilina	16,7	33,3	50,0
Amoxicilina	50,0	33,3	16,7
Amoxicilina/Ácido	16,7	33,3	50,0
Clavulânico			
Cefalotina	50,0	0,0	50,0
Ceftriaxona	0,0	66,7	33,3
Tetraciclina	50,0	16,7	33,3
Gentamicina	50,0	0,0	50,0
Estreptomicina	100,0	0,0	0,0
Amicacina	33,3	33,3	33,3
Ácido nalidíxico	66,7	0,0	33,3
Ciprofloxacina	16,7	0,0	83,3
Cotrimoxazol	16,7	0,0	83,3

6- Discussão

A *Escherichia coli* extraintestinal, segundo EISENTEIN & JONES (1988) e ORSKOV & ORSKOV (1985) pode causar diversas infecções extraintestinais.

Uma variedade de cepas de *E. coli* incluindo a *E. coli* attaching-effacing (AEEC) e a *E. coli* Shiga toxigênica (STEC) têm sido associadas à diarreia em cachorros enfermos (BEUTIN, 1999). No entanto, BENTANCOR em 2006 relatou isolamentos ocasionais tanto em fezes de cães diarréicos como em cães saudáveis.

A frequência de isolamento de cepas STEC em cães sem infecções intestinais e urogenitais são altamente variáveis (JOHNSON et al, 2001, STAATS et al, 2003; BENTANCOR et al, 2007). Um estudo na Alemanha descreveu uma prevalência de cerca de 4,0% e 14,0% em animais de estimação saudáveis e diarréicos respectivamente (BEUTIN et al, 1993). No presente trabalho foi observada uma prevalência de 22,8 %, concordando com o trabalho citado anteriormente.

A ocorrência de genes *stx* (40,0%) entre animais diarréicos portadores de STEC no presente estudo concorda com o resultado relatado por HAMMERMULER et al (1995) de 44,4% para as cepas STEC, assim como a frequência dos genes *stx* 1 e *stx* 2 entre as cepas STEC, mas não a frequência dos dois genes juntos. No entanto, o presente estudo contrasta com o trabalho de HAMMERMULER et al (1995) o qual encontrou uma predominância do gene *stx* 2 entre as cepas STEC, enquanto que no presente

estudo a detecção do gene *stx 1* (7,6%) e do gene *stx 2* (5,4%) (Tabela 4) foram praticamente idênticos.

A distribuição de genes *stx 1* e *stx 2* entre cães diarréicos no presente estudo está de acordo com outros estudos (STAATS et al, 2003; BENTANCOR et al, 2007). Entretanto, NAZAKATO et al (2004) trabalhando no Brasil não encontrou cepas STEC portadoras dos genes *stx 1* ou *stx 2* entre 146 cães diarréicos e 36 cães saudáveis analisados.

O gene *eae* tem sido demonstrado em cepas AEEC isoladas de cães, e lesões do tipo attaching-effacing foram demonstrados em tecidos intestinais de cães (BROES et al, 1988; DROLET et al, 1994; BEAUDRY et al, 1996). Uma vez que a existência do gene *eae* esta diretamente correlacionada com o fenótipo attaching-effacing, a detecção do gene *eae* em *E. coli* representa uma evidência suficiente para assegurar um potencial de virulência (NATARO & KAPER, 1998). No presente estudo quatro animais (16,0%) possuíam cepas AEEC com o gene *eae* o que esta de acordo com o trabalho de NAZAKATO et al (2004) (12,6%), mas são bastante diferentes dos trabalhos de BEAUDRY et al (1996) com 69,2% e BENTANCOR et al (2007) com 66,7%.

KRAUSE et al (2005) relataram o isolamento de cepas AEEC apresentando comportamento típico de *E. coli* Enteropatogênica (EPEC) (*eae* + *bfpA*+) de cães, o que reforçou dados anteriormente publicados (GOFFAUX et al, 2000; NAKAZATO et al, 2004). Os cães vivem em contato direto com humanos e a transmissão de cepas de *E. coli* é bastante provável. RODRIGUES et al (2004) descreveram um caso de infecção cruzada entre um

cachorro e uma criança na mesma casa de uma cidade do estado de São Paulo, Brasil.

As *E. coli* hemolíticas são comuns em cães saudáveis e em cães com infecções intestinais e extraintestinais (WILSON et al, 1988; BEUTIN, 1999). Entre as STEC isoladas examinadas no presente trabalho, a atividade α -hemolítica foi predominante (52,3%), no entanto, o significado da produção de α -hemolisina em cepas causando doença entérica em cães e seu impacto como potencial fator de virulência precisa ser melhor investigado.

O contato muito próximo entre animais e humanos em um mesmo lar oferece condições favoráveis para a transmissão da bactéria por contato direto (acariciando, lambendo, feridas físicas, etc) ou através do ambiente doméstico (contaminação do alimento, acessórios, etc). Crianças apresentam riscos maiores de contaminação do que os adultos por causa do seu maior contato físico com cães, assim como com objetos do lar contaminados pelos animais de estimação. Bactérias resistentes selecionadas pelo uso de antimicrobianos em animais de estimação podem alcançar um hospedeiro humano e transferir seus genes de resistência para as bactérias residentes no hospedeiro humano ou vice versa (GUARDABASSI et al., 2004), assim pode-se concluir que os isolados de cães neste trabalho produziram uma evidência, sugerindo que os animais de companhia podem ser importantes reservatórios de estirpes de *E. coli* resistentes a antimicrobianos, mostrando que mais estudos são requeridos para um maior esclarecimento do impacto do uso dos antimicrobianos na medicina veterinária.

Membros da maioria das classes de antimicrobianos como as tetraciclínas, macrolídeos, lincosamidas, aminoglicosídeos, penicilinas e cefalosporinas, têm sido usados a um longo tempo na medicina humana e na veterinária, e os mesmos genes de resistência foram identificados em bactérias provenientes de humanos e de animais de estimação (SORUM & SUNDE, 2001; PHILLIPS et al., 2004).

NORMAND et al. (2000) relataram a análise de cepas de *E. coli* obtidas de casos clínicos em animais de companhia (cães e gatos) no Reino Unido entre 1989 e 1997, as porcentagens de resistência antimicrobiana descritas pelos autores estão de acordo com aquelas relatadas no presente estudo, com exceção da gentamicina (2,0%) e da enrofloxacina (3,0%). Embora a autorização para uso de fluoroquinolonas na prática veterinária de pequenos animais é bastante recente na Europa (início da década de 1990), a resistência para essa classe de antimicrobianos está aumentando entre as bactérias provenientes de animais de estimação (GUARDABASSI et al., 2004). No presente estudo a porcentagem de resistência para ciprofloxacina foi alta (19,2%) e a liberação para uso veterinário no Brasil foi mais recente do que na Europa o que poderia indicar um emprego exagerado e incorreto desta droga antimicrobiana na prática veterinária no Brasil.

CARATTOLI et al. (2005) analisaram 298 cepas de *E. coli* obtidas de uma amostragem de 204 cães submetidos a diagnósticos de rotina na Itália entre 2001 e 2003. As porcentagens de resistência relatadas por esses autores são bastante similares aquelas do nosso estudo para a tetraciclina, ácido nalidíxico,

cotrimoxazol e fluoroquinolonas, mas muito diferentes para a gentamicina (8,1%) e amicacina (0,7%).

A existência do fenótipo de multirresistência entre bactérias provenientes de animais tem criado uma grande preocupação entre os médicos veterinários. SANCHEZ et al. (2002) relataram o isolamento de cepas de *E. coli*, provenientes de dois cães, resistentes a doze drogas antimicrobianas. WARREN et al (2001) relataram o isolamento de 18 cepas de *E. coli* multirresistentes provenientes de dez cães na Austrália, todas elas mostrando uma atividade de β lactamase de espectro estendido. NORMAND et al (2000) descreveram que 30,0% das cepas de *E. coli* dos cães examinados na Inglaterra eram multirresistentes. Infecção canina ou a presença desta bactéria representam um risco potencial para pessoas em contato com o animal, devido ao risco de disseminação dos genes de resistência. Neste estudo uma grande porcentagem de bactérias apresentando fatores de virulência também apresentou um fenótipo de multirresistência (71,4%) o que representa um motivo de preocupação. O monitoramento da resistência antimicrobiana é um requisito para avaliar a magnitude do problema.

As infecções bacterianas do trato urinário estão entre as infecções mais frequentes na prática veterinária de pequenos animais. Durante sua vida, cerca de 14% dos cães terão pelo menos uma infecção do trato urinário. (POLZIN, 1997)

As ExPEC constituem 20% das *E. coli* intestinais, porém é importante dizer que o isolamento de uma cepa de *E. coli* em pacientes com infecção

extraintestinal não confere o termo ExPEC, pois uma simples cepa comensal de *E. coli* também poderia causar infecção extraintestinal, para ser considerado ExPEC a cepa de *E. coli* tem que ter necessariamente 2 ou mais fatores de virulência e estabelecer infecção em indivíduos saudáveis (JOHNSON & RUSSO, 2002; RUSSO & JOHNSON, 2000).

A propriedade de virulência inclui a capacidade de aderência às células epiteliais através da fímbria, bem como a habilidade de produção de hemolisina e aerobactina (VÄISENEN-RHEN, et al, 1984; FÜNFSÜCK et al, 1989). É importante esclarecer que não é possível caracterizar uma bactéria uropatogênica através da análise de um único fator de virulência isolado, pois somente com a combinação de vários fatores é possível avaliar o agente patogênico.

Segundo FÉRIA et al (2001) 43% das cepas identificadas como *E. coli* isoladas de cães e gatos com ITU possuíam o gene *pap*, 57% o gene *sfa* e 1% o gene *afa*. No presente trabalho foram isoladas cepas de *E. coli* obtidas de cães diarréicos e foi encontrada uma proporção diferente daquela descrita no do trabalho acima citado, no presente trabalho nenhuma cepa apresentou o gene *afa*, 1,08% gene *sfa* e 11,95% gene *pap*.

Segundo MAYNARD et al (2004) a maioria dos isolados de ExPEC apresentaram as maiores resistências antimicrobianas para ampicilina, tetraciclina e sulfonamidas, sugerindo que estas altas resistências se devem ao seu uso no mercado há bastante tempo. O presente trabalho apresentou baixas resistências para ampicilina e cotrimoxazol, discordando com o trabalho

anteriormente citado, mas concorda com uma resistência relativamente alta para a tetraciclina.

Neste trabalho foi relatada uma alta incidência de cepas multirresistentes aos antimicrobianos testados, isto provavelmente ocorreu devido ao uso indiscriminado de vários antimicrobianos, acumulando, assim, genes de resistência, o que coincide com o que foi relatado por MAYNARD et al (2004) que identificou cepas de ExPEC de origens animal e humana apresentando multirresistência.

Os dados apresentados neste trabalho indicam um alto risco de patogenicidade das cepas de *E. coli* isoladas de cães diarréicos, seja devido a sua característica como STEC ou ExPEC, seja devido a suas altas freqüências de resistência a drogas antimicrobianas ou a existência de cepas multiresistentes entre os isolados . A combinação destes elementos indica a necessidade de um controle mais efetivo sobre a microbiota dos animais de companhia cães e gatos. É importante que pesquisas envolvendo cães saudáveis, livre de sintomas de colibacilose, sejam feitas para se verificar se estes podem ser confirmados como reservatórios na cadeia epidemiológica, verificando-se quais são os genes de patogenicidade encontrados com maior freqüência bem como a sua possível transmissão para o homem.

7. Conclusões

1-) Foram identificadas 92 cepas de *E. coli* provenientes de 25 cães diarréicos.

2-) De uma forma geral as cepas de *E.coli* isoladas apresentaram um elevado grau de resistência a vários agentes antimicrobianos.

3-) Foi encontrado um elevado número de cepas apresentando multiresistência a quatro ou mais agentes antimicrobianos.

4-) Das cepas estudadas, 21 cepas foram caracterizadas como STEC sendo que 7 cepas apresentaram o gene *stx 1*, 5 cepas o *stx 2* e 9 cepas a presença do gene *eae*.

5-) Entre as 92 cepas de *E. coli* estudadas foram identificadas 10 cepas caracterizadas como ExPEC por apresentarem 2 ou mais fatores de virulência.

8. Referências

AHMED,A.A.; OSMAN,H.; MANSOUR, A.M.; MUSA, H.A.; AHMED, A.B.; KARRAR, Z.; HASSAN, H.S. Antimicrobial agent resistance in bacterial isolates from patients with diarrhea and urinary tract infection in the Sudan. **Am. J. Trop. Med.**, p.259-263, 2000.

ANGULO, F.J., JOHNSON, K., TAUXE, R.V., COHEN, M.H. Significance and sources of antimicrobial – resistant nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. **Microbiol. D. Res.**, v. 6, p. 77-83, 2000.

BAUER, A. W. ; KIRBY, W. M.M.; SHERRIS, J.C. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. **Amer. J. of Clin. Path.**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BAUER, R.J.; ZHANG, L.; FOXMAN, B.; SIITONEN, A.;JANTUNEN, M.E.; SAXEN, H.; MARRIS, C.F.J. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection – *usp*, *iha* and *iro N* *E. coli* **Infect. Dis.**, v. 185, p. 1521-1524, 2002.

BEAUDRY, M.; ZHU, C.; FAIRBROTHER, J.M.; HAREL, J. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. **J. Clin. Microbiol.**, v.14, p. 144-148, 1996.

BENTANCOR, A.; RUMI, M.V.; GENTILINI, M.V.; SARDOY, C.; IRINO, K.; AGOSTINI, A.; CATALDI, A. 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.**, v.267, p. 251-256, 2007.

BENTANCOR, A. Epidemiological role of pets in urban transmission cycle of STEC. **Medicina**, v.66, p. 37-41, 2006.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINHUCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEUTZ, F.; Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like-toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 2483-2488, 1993.

BEUTIN, L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. **Vet. Res.**, v. 30, p. 285-298, 1999.

BEUTIN, L.; KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; KAUFUSS, S.; GLEIER, K. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1099-1108, 2004.

BIER, O. **Microbiol. imun.** 24 ed. São Paulo, p. 615-619, 1985.

BINDEREIF, A.; NEILANDS, J.B. Cloning of the aerobactin-mediated iron assimilation system of plasmid COL V. **J. Bacteriol.**, v.153, n.2, p. 1111-1113, 1985.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; BALSALOBRE, C.; MUÑOZA, F.; JUAREZ, A.; BLANCO, J. Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. **Rev. Microbiol.**, v.148, p. 745-755, 1997.

BLANCO, M. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae* ϵ). **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 645-651, 2004.

BROES, A. DROLET, R.; JACQUES, M.; FAIRBROTHER, J.M.; JOHNSON, W.M. Natural infection with an attaching and effacing *Escherichia coli* in a diarrheic puppy. **Can. J. Vet. Res.**, v.52, p. 280-282, 1988.

BYWATER, R., DELUYKER, H., DEROOVER, E., de JONG, A., MARION, H., McCONVILLE, M., ROWAN, T., SHRYOCK, T., SHUSTER, D., THOMAS, V., VALLE, M., WALTERS, J. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and comensal bacteria isolated from food-producing animals. **J. Antimicrob. Chem.**, v. 54, p. 744-754, 2004.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res.**, v.36, p. 289-311, 2005.

CAPRIOLLI, A., BUSANI, L., MARTEL, J.L. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. **Intern. J. of Antim. Ag.**, v. 14, p. 295-301, 2000.

CARATTOLI, A.; LOVARI, S.; FRANCO, A.; CORDARO, G.; DI MATTEO, P.; BATTISTTI, A. Extended-spectrum β -lactamase in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 833-835, 2005.

CARBONETTI, N.H.; WILLIAMS, P.H. A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid Col V - K30. **Infect. Immun.**, v.46,n.1, p.7-12, 1984.

CAVALIERI, S.J.; BOHACH, G.A.; SNYDER, I.S. *Escherichia coli* α -hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. **Microbiol. Rev.**, v.48, n.4, p.326-343, 1985.

CHAPMAN, P.A.; MALO, A.T.C.; ELLIN, M.; ASHTON, R.; HARKIN, M.A. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses, and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 64, p. 139-150, 2001.

CHINA, B. ; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 62, p. 3462-3465, 1996.

COHEN, M.L. Changing patterns of infections disease. **Nature**, v. 406, p. 762-767, 2000.

DONNELLY, J.P., VOSS, A., WHITE, W., MURRAY, B.E. Does the use in animals of antimicrobial agents, including glycopeptide antibiotics influence the efficacy of antimicrobial therapy in humans? **J. Antimic. Chemoth.**, v. 37, p. 389-392, 1996.

DROLET, R.; FAIRBROTHER, J.M.; HAREL, J.; HÉLIE, P. Attaching and effacing enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog. **Can. J. Vet. Res.**, v. 58, p. 87-92, 1994.

DUGUID, J. P.; SMITH, I. W.; DEMPSTER, G.; EDMUNDS, P.N. Non-flagellar filamentous appendages (“fimbriae”) and hemagglutinating activity in *Bacterium coli*. **J. Path. Bact.**, v.70, p. 335-348, 1955.

EDWARDS, P.R.; EWING, W.H. **Identification of Enterobacteriaceae**. 3^a ed. Minneapolis, Burgess, 1972.

EISENSTEIN B. I., JONES G. W. The spectrum of infections pathogenic mechanisms of *Escherichia coli*. *Adv. Intern. Med.* 1988; 33:231-52.

FELMLEE, T.; PELLETT, S.; WELCH, R. Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. **J. Bacteriol.**, v. 163, n.1, p.94-105, 1985.

FÉRIA, C.; MACHADO, J.; CORREIA, J.D.; GONÇALVES, J.; GAASTRA, W. Virulence genes and P fimbriae PapA subunit diversity in canine and feline uropathogenic *Escherichia coli*. **Vet. Microbiol.** v.82, p. 81-89, 2001.

FÜNFSTÜCK, R.; TSCHAPE, H.; STEIN, G.; VOLLANDT, R.; SCHNEIDER, S. Virulence of *Escherichia coli* strains in relation to their hemolysin formation, mannose-resistant hemagglutination, hydroxamate production, K 1-antigen and the plasmid profile in patients with chronic pyelonephritis. **Clin. Nephrology**, v.32, n.4, p.178-184, 1989.

GOFFAUX, F.; CHINA, B.; JANSSEN, L.; MAINIL, J. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. **Res. Microbiol.**, v. 151, p. 865-871, 2000.

GREEN, C.P.; THOMAS, V.L. Hemagglutination of human type O erythrocytes, hemolysin production, and serogrouping of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria. **Infect. Immun.**, v.31, n.1, p. 309-315, 1981.

GUPTA, K.; SAHM, D.F.; MAYFIELD, D.; STAMM, W.E. Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community - acquired urinary tract infections in women: a national analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v.33, p.89-94, 2001b.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 54, p. 321-332, 2004.

GUYER, D.M.; GUNTHER, N.W.; MOBLEY, H.L.T. Secreted proteins and other features specific to uropathogenic *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, (Suppl 1), p.S32-35, 2001.

HACKER, J.; HUGHES, C.; HOF, H.; GOEBEL, W. Cloned hemolysin genes from *Escherichia coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice. **Infect. Immun.**, v.42, n.1, p.57-63, 1983.

HAGBERG, L.; JODAL, U.; KORHONEN, T.K.; LIDIN-JANSON, G.; LINDBERG, U.; SVANBORG-ÉDEN, C. Adhesion, hemagglutination and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. **Infect. Immun.**, v.31, n.2, p. 564-570, 1981.

HUGHES, C.; HACKER, J.; ROBERTS, A.P.; GOEBEL, W. Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.39, n.2, p.546-551, 1983.

HAMMERMUELLER, J.; KRUTH, S.; PRESCOTT, J.; GYLES, C. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. **Can. J. Vet. Res.**, v. 59, p. 265-270, 1995.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiol. Méd.**, 20 ed., p.99-129, 1998.

JOHNSON, J.R. MONSELEY, S.L.; ROBERTS, P.; STAMM, W.E. Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: association with patient characteristics. **Infect. Immun.**, v.56, p. 405-412, 1988.

JOHNSON, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.4, p. 80-128,1991.

JOHNSON, J.R.; STELL, A.L.; DELAVARI, P. Canine feces as a reservoir of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1306-1314, 2001.

JOHNSON, J.R., RUSSO, T. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*". **J. Lab. Clin. Med.**, v.139, n.3, p. 155-162, 2002.

KARLOWSKY, J.A.; KELLY, L.J.; THORNSBERRY,C.; JONES, M.E.; SAHM, D.F. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. **Antimicrob. Ag. Chemother.**, v.46, n.8, 2002.

KESKIMAKI, M.; EKLUND, M.; PESONEM, H.; HEISKANEM, T.; SIITONEM, A. The study group. SPEC, EAEC, and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diag. Microbial. Infect. Dis.** V.40, p.151-156, 2001.

KNOTHE, H. A review of the medical considerations of the use of tylosin and other macrolide antibiotics as additives in animal feeds. **Infection**, v. 5, p. 183-187, 1977.

KNUTTON, S.; PHILLIPS, A.D.; SMITH, H.R.; GROSS, R.J.; SHAW, R.; WATSON, P.; PRICE, P. Screening for enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with diarrhea by the fluorescent-actin staining test. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 365-371, 1991.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL JR., V.R.; SOMMERS, H.M. **Diagn. Microbiol.** Texto e atlas colorido. 2ª ed. São Paulo, Editora Panamericana, p. 61- 132, 1997.

KÖNIG, B.; KÖNIG, W.; SCHEFFER, J.; HACKER, J.; GOEBEL, W. Role of *Escherichia coli* alpha-hemolysin and bacterial adherence in infection: requirement for release of inflammatory mediators from granulocytes and mast cells. **Infect. Immun.**, v.54, p. 886-892, 1986.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin-(*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. **Vet. Microbiol.**, v. 106, p. 87-95, 2005.

LATHAM, R.H.; STAMM, W.E. Role of fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections in adult women: correlation with localization studies. **J. Infect. Dis.**, v.149, n.6, p. 835-840, 1984.

LAW, D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 729-745, 2000.

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. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, n.5, p.1189-1193, 1992.

LEVY, S.B. The antibiotic Paradox. How the misuse of antibiotics destroy their curative powers. **Pers. Publis.** 2nd ed., Cambridge, MA 2002.

LINGGOOD, M.; ROBERTS, M.; FORD, S.; PARRY, S.W.; WILLIAMS, P.H. Incidence of the aerobactin uptake system among *Escherichia coli* from chickens. **J. Gen. Microbiol.** V.133, p. 835-842, 1987.

LOMAR, A.V.; DIAMENT, D. Guia de terapia antiinfeciosa, v.1, p.11-44, 1998.

MANGES, A.R.; JOHNSON, J.R.; FOXMAN, B.; O'BRYAN, T.T.; FULLERTON, K.E.; RILEY, L.W. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. **N. Engl. J. Med.**, v.345, n.14, p.1007-1013, 2001.

MARTINEZ, J.L.; CERCENADO, E.; BAQUERO, F.; PÉREZ-DIAZ, J.C.; DELGADO-IRBARREN, A. Incidence of aerobactin production in Gram-negative hospital isolates. **FEMS Microbiol. Letters**, v.43, p. 351-353, 1987.

MAYNARD, C.; BEKAL, S.; SANSCHAGRIN, F.; LEVESQUE, R.C.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L.; LARIVIÈRE, S.; HAREL, J. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal

Escherichia coli isolates of animal and human origin. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p. 5444-5452, 2004.

MEAD, P.S.; GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet**, v. 352, p. 1207-1212, 1998.

MENG, J., ZHAO, S., DOYLE, M.P., JOSEFH, S.W. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O 157: H7 and O157: NM isolated from animals food and humans. **J. Food Protec.**, v.6, p. 1511-1514, 1998.

MINSHEW, B.H.; JORGENSEN, J.; COUNTS, G.W.; FALKOW, S. Association of hemolysin production, hemagglutination of human erythrocytes, and virulence for chicken embryos of extraintestinal *Escherichia coli* isolates. **Infect.Immun.** v.20, n.1, p.50-54, 1978.

MOBLEY, H.L.T.; GREEN, D.M.;TRIFILLIS, A.L.; JOHNSON, D.E.; CHIPPENDALE, G.R.; LOCKATELL, V.; JONES, B.D.; WARREN, J.W. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cell: role of hemolysin in some strains. **Infect. Immun.**, v.58, n.5, p.1281-1289, 1990.

MONTGOMERIE, J.Z.; BINDEREIF, A. NEILANDS, J.B.; KALMANSON, G.M.; GUZE, L.B. Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. **Infect. Immun.**, v. 46, n.3, p. 835-838, 1984.

NAKAZATO, G.; GYLES, C.; ZIEBELL, K.; KELLER, R.; TRABULSI, L.R.; GOMES, T.A.T.; IRINO, K.; SILVEIRA, W.D.; PESTANA DE CASTRO, A.F.

Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Vet. Microbiol.**, v. 101, p. 269-277, 2004.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**,v. 11, p. 142-201, 1998.

NORMAND, E.H.; GIBSON, N.R.; CARMICHAEL, S.; REID, S.W.J.; TAYLOR, D.J. Trends of antimicrobial resistance in bacterial isolates from a small animal referral hospital. **Vet. Rec.**, v. 146, p. 151-155, 2000.

NOLAN,L.K.; WOOLEY R.E., BROWN J., BLUE J.L., CAMP M. comparison of virulence factors and antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* strain from humans and dogs with urinary tract infections. **J. Vet. Int. Med.** p. 152-157, 1987.

ORDEN, J.A., RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A., GARCIA, S., CID, D., DE LA FUENTE, R. In vitro susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic dairy calves to 15 antimicrobial agents. **J. Vet. Med. B.**, v. 47, p. 329-335, 2000.

ORSKOV, I. ORSKOV, F. *Escherichia coli* in extraintestinal infections. **J. Hyg.** (London). 1985; 95:51-75.

PATTON, J.P., NASH, D.B., ABRUTYN, E. Urinary tract infection: economic considerations. **Med. Clin. North Am.**1991; 75: 495-513.

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 450-479, 1998.

PELCZAR JUNIOR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia, conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: **Makron Books do Brasil**, v.2, p.111-125, 1997.

PRADA, J., BALJER, G., De RICKE, J., STEINRUCK, H., ZIMMERMANN, S., STEPHAN, R., BEUTIN, L. Characteristics of α -hemolytic strain of *Escherichia coli* isolated from dogs with gastroenteritis. **Vet. Microbiol.**, 29. p. 59-73, 1991.

PRESCOTT, J. F., HANNA W. J. B., SMITH R. R., DROST K. Antimicrobial drug use and resistance in dogs. **Can. Vet. J.** 43, p. 107-116, 2002.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; DE GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 53, p. 28-52, 2004.

PIDDOCK, L.J.V. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 38, p. 1-3, 1996.

POLZIN, D.J. Management of recurrent bacterial urinary tract infections. **Suppl. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.** v. 19, p.49-52, 1997.

RATNAM, S., MARCH, S.B., AHMED, R., BEZANSON., G.S., KASATIYA, S. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157: H7. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, n. 10, p. 2006 – 2012, 1988.

RODRIGUES, J.; THOMAZINI, C.M.; LOPEZ, C.A.M.; DANTAS, L.O. Concurrent infection in a dog and colonization in a child with human enteropathogenic *Escherichia coli* clone. **J. Clin. Microbiol.**, V. 42, P. 1338-1339, 2004.

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, p. 1753-1754, 2000.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold. Spring Harbor**. Laboratory Press, 1989.

SANCHEZ S., STEVENSON M. A., HUDSON C. R., MAIER M. BUNFINGTON T., DAM Q., MAURER J. J. Characterization of multidrug-Resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infection in dogs. **J. Clin. Microbiol.** 40(10). p. 3586-3595. 2002.

SHARMA, S.; HARJAI, K.; MITTAL, R. Enhanced siderophore production and mouse kidney pathogenicity in *Escherichia coli* grown in urine. **J. Med. Microbiol.** V.35, p. 325-329, 1991.

SMITH, H.W. The haemolysins of *Escherichia coli*. **J. Pathol. Bacteriol.**, v.85, p. 197-211, 1963.

SOBEL, J.D. Bacterial etiologic agents in the pathogenesis of urinary tract infection. **Med. Clin. North Am.**, v.75, n.2, p.253-273, 1991.

SORUM, H.; SUNDE, M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. **Vet. Res.**, v. 32, p. 227-241, 2001.

STAATS, J.J.; CHENGAPPA, M.M.; DEBEY, M.C.; FICKBOHM, B.; OBERST, R.D. Detection of *Escherichia coli* Shiga toxin and enterotoxin (*est A* and *elt*) genes in fecal samples from non-diarrheic and diarrheic greyhounds. **Vet. Microb.**, v. 94, p. 303-312, 2003.

SUMMERS, A.O. Generally overlooked Fundamentals of bacteria genetics and ecology. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. S85-S92, 2002.

SVANBORG-EDÉN, C.; HANSSON, H.A. *Escherichia coli* pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells. **Infect. Immun.**, v.21, n.1, p. 229-237, 1978.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 493-499, 2001.

TOMISAWA, S.; KOGURE, T.; KUROUME, T.; LEFFLER, H.; LOMBERG, H.; SHIMABUKORO, N.; TERAOKA, K.; SVANBORG-EDÉN, C. P blood group and proneness to urinary tract infection in Japanese children. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.21, p.404-408, 1989.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiol.** terceira ed., ed. Atheneu, Rio de Janeiro. 586 p., 2002.

VÄISANEN-RHEN, V.; ELO, J.; VÄISANEN, E.; SIITONEM, A.; ORSKOV, I.; ORSKOV, A.; ORSKOV, F.; SVENSON, S.B.; MÄKELÄ, P.H.; KORHONEN, T.K. P -fimbriated cones among uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Infect. Immun.**, v.43, n.1, p.149-155, 1984.

Van den BOGAARD, A.E., STOBBERINGH, E. Epidemiology of resistance to antibiotic. Links between animals and humans. **Internat. J. Antimicrob. Agents**, v. 14, p. 327-325, 2000.

VALVANO, M.A.; CROSA, J.H. Aerobactin iron transport genes commonly encoded by certain Col V plasmids occur in the chromosome of a human invasive strain of *Escherichia coli* K1. **Infect. Immun.**, v.46, p.159-167, 1984.

VALVANO, M.A.; SILVER, R.P.; CROSA, J.H. Occurrence of chromosome or plasmid-mediated aerobactin iron transport systems and hemolysin production among clonal groups of human invasive strains of *Escherichia coli* K1. **Infect. Immun.**, v.52, n.1, p.192-199, 1986.

WARREN, A.I.; TOWNSEND, K.M.; KING, T.; MOSS, S.; O'BOYLE, D.; YATES, R.M.; TROTT, D.J. Multi-drug resistant *Escherichia coli* with extended-spectrum β -lactamase activity and fluoroquinolone resistance isolated from clinical infections in dogs. **Aust. Vet. J.**, v. 79, p. 621-623, 2001.

WATANABE, D.S.A.; DECARLIS, R.M.S.T.; MICHELIN, L.A.; MONTELLI, A.C. Fatores de virulência de amostras urinárias de *Escherichia coli*. **Rev. Microbiol.**, v.19, p.123-128, 1988.

WATSON, J.D., GILMAN M., WITKOWSKI J., ZOLER M. O DNA Recombinante: segunda edição, 1997.

WEGENER, H.C.; AARESTRUP, F.M.; GERNER-SMIDT, P.; BAGER, F. Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. **Acta Vet. Scand.**, v. 92, p. 51-57, 1999.

WILLIAMS, P.H. Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.26, n.3, p.925-932, 1979.

WILLIAMS, P.H.; CARBONETTI, N.H. Iron, siderophores, and the pursuit of virulence: independence of the aerobactin and enterochelin iron uptake systems in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.51, n.3, p.942-947, 1986.

WILSON, R.A.; KEEFE T J, DAVIS, M. A.; BROWNING, M. T.; ONDRUSEK, K. Strains of *Escherichia coli* associated with urogenital disease in dogs and cats. **Am. J. Vet. Res.**, v. 49, p. 743-746, 1988.

WHITE, D.G, ZHAO, S., SIMJEE, S., WAGNER, D., McDERMOTT, P.F. Antimicrobial resistance of food borne pathogens. **Microb. and Infection**, v. 4, p. 405-412, 2002.

YOUMANS,G.P.; PATERSON, P.Y.; SOMMERS, H.M. Bases biológicas e clínicas das doenças infecciosas. 2.ed, p.809-879, 1983.

Summary

Dogs have been proposed as a possible reservoir of the pathogenic *Escherichia coli* that causes infection in dogs and human beings. From January to December 2006, 92 *E. coli* isolates from 25 diarrheic dogs were analyzed by screening for the presence of Shiga toxin-producing (*stx* 1 and *stx* 2) and intimin (*eae*) genes. Twelve Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) isolates were detected by PCR to harbor the Shiga toxin genes, 7 isolates the *stx* 1 (7.6%); 5 the *stx* 2(5.4%) and none both of them. Nine (9.8%) of the *E. coli* isolates studied were *eae* positive non Shiga toxin-producing. The *E. coli* isolates also were screened for the presence of adhesion-encoding genes (*pap*, *sfa*, *afa*), hemolysin and aerobactin genes. Virulence gene frequencies detected in those isolates were: 12.0% *pap*, 1.0% *sfa*, 10.0% hemolysin and 6.5% aerobactin. Ten isolates were characterized as extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains. Among STEC and ExPEC isolates was found high level of resistance to antimicrobial agents and some of them as characterized as multidrug resistant *E. coli* (MDREC), what represent a reason for concern due the risk of dissemination of antimicrobial resistant genes to the microbiota of human beings.

Key Words: *Escherichia coli*, STEC, ExPEC, dog, antimicrobial resistance, multidrug-resistance.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)